

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie



**Albert Málek**

Klinicky relevantní protein-proteinové interakce v procesu bakteriální patogeneze *B. pertussis*

Clinically relevant protein-protein interactions participating in process of bacterial pathogenesis *B. pertussis*

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Konzultantka: Ing. Adriana Osičková PhD.

Praha, 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením mého školitele doc. RNDr. Miroslava Šulce, Ph.D., a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 12.1. 2020

Albert Málek

## **Poděkování**

Děkuji mému školiteli doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. za jeho nápadité komentáře, osobitý přístup a nekonečnou trpělivost při vedení této bakalářské práce.

Děkuji také mojí konzultantce Ing. Adrianě Osičkové PhD. za přípravu použitého expresního plasmidu.

Práce byla podpořena projektem GAČR 20-28126S.

## Abstract

Whooping cough in human population was strongly suppressed during the 20th century. But in the past few years, the incidence of whooping cough began to rise. The origin of this disease is a pathogenic gram-negative bacteria *Bordetella pertussis*, which is becoming resistant to currently used antibiotics or vaccination.

*B. pertussis* attacks human respiratory system. One of its virulent factors is adenylate cyclase toxin (ACT). It is secreted extracellularly from bacteria and binds to cytoplasmic membrane of host cells and translocates adenylate cyclase domain (dAC) to cytosol. This enzymatic domain is activated by non-covalent interaction with eukaryotic Calmodulin (CaM). After its activation, dAC in high concentrations synthesizes cAMP, triggering host cell's apoptosis.

We studied protein interaction of dAC with CaM by the PIXL method (Photo Induced Cross Linking) and mass spectrometry (MS). Mutant of dAC, with photo-methionine (pM), incorporated in position of Leucine 240 (dACL240pM) was expressed in transformed *E. coli* cells B834 in mineral medium containing pM. Expressed protein was isolated by affinity chromatography and characterized by MS (determined incorporation of pM was approximately 50 % in the final protein preparation).

We performed a photochemical cross-linking with isolated dACL240pM and CaM. Cross-linking was also undertaken with dAC mutant with incorporated pM in position of Leucine 241 (dACL241pM). Position L241 and L240 was selected with respect to assumed participation of W242 in dAC-CaM binding cavity. Products of photochemical cross-linking were isolated by SDS-PAGE and visualized by Coomassie Brilliant Blue R250. Covalently cross-linked proteins were proteolytically cleaved and characterised by MALDI-TOF MS after proteolysis.

The formation of heterodimer dAC-CaM was occurred with a small yield. We can only speculate on structure of the heterodimer according to data from MALDI-TOF MS, because we identified peptides of both proteins in analysed protein band. Nevertheless, we don't know exact position of interaction sites or ratio of both participating proteins. Due to that, we can only speculate on potential formation of heterotetramer consisting of two molecules of dAC and two molecules of CaM, or on formation of heterotrimer consisting of two molecules of dAC and one molecule of CaM. The photochemical cross-linking occurred only if there were CaM and free calcium ions in the reaction mixture. That highlights specificity of this interaction.

**Key words:** *B. pertussis*, bacterial pathogenesis, photo-Met, photo-induced cross-linking (PIXL), mass spectrometry

In Czech:

## Abstrakt

Výskyt černého kašle v lidské populaci byl v průběhu 20. století díky vakcinaci silně potlačen. V posledních letech však začala incidence černého kašle opět narůstat. Původcem této nemoci je patogenní gramnegativní bakterie *Bordetella pertussis*, která začíná být rezistentní vůči dosud používaným antibiotikům či vakcínám.

*B. pertussis* napadá dýchací cesty člověka. Jedním z jejích virulentních faktorů je adenylátcyklázový toxin (ACT). Ten je sekretován z bakteriálních buněk do extracelulárního prostoru, váže se na plasmatickou membránu hostitelské buňky a translokuje do jejího cytosolu adenylátcyklázovou doménu (dAC). Tato enzymatická doména se aktivuje nekovalentní interakcí s eukaryotním kalmodulinem (CaM) a syntetizuje cAMP, jehož nadbytek má za následek apoptózu hostitelské buňky.

Proteinovou interakci dAC s CaM jsme studovali pomocí metody PIXL (fotochemické zesítnění, z angl. „Photo Induced Cross Linking“) a hmotnostní spektrometrie (MS). Mutantní protein dAC, s inkorporovaným foto-Methioninem (pM) na pozici Leucinu 240 (dACL240pM), jsme exprimovali v transformovaných buňkách *E. coli* B834 v minerálním médiu s pM. Exprimovaný protein jsme izolovali afinitní chromatografií a pomocí MS stanovili inkorporaci pM do primární struktury dAC na přibližně 50 % ve finálním preparátu.

S izolovaným dACL240pM a CaM jsme provedli fotochemické zesítnění. Zesítnění s CaM jsme provedli také s dAC s inkorporovaným pM na pozici Leucinu 241 (dACL241pM). Pozice L241 a L240 byly zvoleny s ohledem na předpokládanou participaci W242 ve vazebném místě dAC-CaM. Produkty fotochemického zesítnění byly izolovány pomocí SDS-PAGE a vizualizovány barvením v Coomassie Brilliant Blue R250. Kovalentně zesítněné proteiny byly proteolyticky štěpeny a charakterizovány pomocí MALDI-TOF MS.

K fotochemickému zesítnění a vzniku heterodimeru dAC-CaM došlo v malé míře o velikosti přibližně 100 kDa. O složení heterodimeru lze pouze spekulovat na základě MALDI-TOF MS, protože v heterodimeru byly identifikovány peptidy obou proteinů. Nicméně neznáme místo interakce a vzájemný poměr obou proteinů. Proto můžeme pouze spekulovat o možné tvorbě heterotetrameru ze dvou molekul dAC a dvou molekul CaM, či heterotrimeru dvou molekul dAC a jedné molekuly CaM. Fotochemické zesítnění se uskutečnilo pouze pokud byl v reakční směsi přítomný CaM a volné vápenaté kationty, což svědčí o specifitě zachycené interakce.

**Klíčová slova:** *B. pertussis*, bakteriální patogeneze, foto-met, technika fotochemického zesítnění (PIXL), hmotnostní spektrometrie

# Obsah

Abstrakt.....	5
1 Seznam zkratk .....	8
2 Teoretický úvod .....	10
2.1 Černý kašel .....	10
2.2 Bakterie <i>Bordetella pertussis</i> .....	12
2.3 Adenylátcyklázový toxin .....	12
2.3.1 Přirozená role cAMP v buňce.....	13
2.3.2 Struktura ACT .....	14
2.3.3 RTX proteiny .....	15
2.3.4 Operon ACT a mechanismus sekrece.....	16
2.3.5 Mechanismus vstupu dAC do hostitelské buňky .....	18
2.3.6 Další vliv ACT na signalizaci v buňce .....	20
2.3.7 Využití ACT ve výzkumu a klinické praxi.....	20
2.4 Metody proteinové analýzy.....	21
2.5 Metody zkoumání protein-proteinových interakcí.....	22
2.5.1 Fotochemické zesítnění – PIXL.....	22
2.5.2 Hmotnostní spektrometrie .....	23
3 Cíle práce.....	26
4 Materiál.....	27
4.1 Chemikálie.....	27
4.2 Bakteriální kmeny .....	29
4.3 Přístroje .....	29
4.4 Materiál .....	30
5 Metody.....	31
5.1 Transformace buněk <i>E. coli</i> B834 .....	31
5.2 Příprava minerálního média LM9A .....	31
5.3 Exprese dACL240pM.....	32
5.4 Izolace dACL240pM .....	34
5.5 Finalizace preparátu dACL240pM.....	35
5.6 Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA) .....	36
5.7 Příprava vzorku proteinového proužku gelu z SDS – PAGE pro MS .....	36
5.8 MALDI-TOF dACL240pM .....	37
5.9 Fotolýza .....	37

6 VÝSLEDKY .....	40
6.1 Produkce a purifikace proteinu dACL240pM .....	40
6.2 Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA) .....	44
6.3 Charakterizace míry inkorporace pM pomocí MALDI – TOF MS .....	45
6.4 Fotolýza .....	46
7 Diskuze .....	52
7.1 Úvod .....	52
7.2 Expres a izolace .....	52
7.3 Studium protein-proteinové interakce dACL240pM s CaM pomocí kombinace metod PIXL a MS .....	53
8 Závěr.....	55
9 Použitá literatura .....	56

# 1 Seznam zkratek

$A_{x\text{ nm}}$	Absorbance při vlnové délce $x\text{ nm}$
Å	Ångström, jednotka délky
ACT	Adenylátcyklasový toxin
ATP	Adenosintrifosfát
$c$	Molární koncentrace v $\frac{\text{mol}}{\text{l}}$ (není-li uvedeno jinak)
CaM	Kalmodulin (z angl. „Calmodulin - CALcium MODULated ProteIN“)
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CBD	Doména vázající chitin (z angl. „Chitin Binding Domain“)
<i>rtxA/B/C/D</i>	Označení genů pro příslušný proteinový produkt
Da	Dalton, hmotnostní jednotka
dAC	Adenylátcyklasová doména
dH <sub>2</sub> O	Deionizovaná voda
DTT	1,4 – dithiothreitol
FIM	Fimbrie
FHA	Vláknitý hemagglutinin
GDP	Guanosindifosfát
GTP	Guanosintrifosfát
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiopyranogalaktosid
M	Methionin
MALDI	Desorpce a ionizace analytu laserem za asistence matrice (z angl. „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization“)
MS	Hmotnostní spektrometrie (z angl. „Mass Spectrometry“)
M <sub>w</sub>	Molekulová hmotnost
OD <sub>600</sub>	Optická denzita při 600nm
PBS	Fosfátový pufr (z angl. „Phosphate Buffered Saline“)
pM	Foto-Methionin (z angl. „Photo-Merhionine“)
PIXL	Fotochemické zesíťení (z angl. „Photo Induced Cross Linking“)



PRT	Pertactin
PT	Pertusový toxin
RPM	Otáčky za minutu (z angl. „Revolutions Per Minute“)
RTX toxiny	Skupina toxinů se specifickými repetitivními aminokyselinovými sekvencemi v primární struktuře (z angl. „Repeats In Toxin“)
SDS	Dodecylsulfát sodný (z angl. „Sodium Dodecyl Sulphate“)
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. „Sodium Dodecyl Sulphate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis“)
TEMED	TEtra-Methylen-Ethylen-Diamin
TOF	Analyzátor hmotnostního spektrometru, měřící dobu průletu analytu letovou trubicí (z angl. „Time Of Flight“)
UV	Ultrafialová část světelného spektra (z angl. „UltraViolet“)
v/v	Objemová procenta
w/v	Hmotnostní procenta vztažená na objem
W	Tryptofan

## 2 Teoretický úvod

### 2.1 Černý kašel

Černý kašel je v Evropě známý již od středověku. V té době byl také označován jako dětský kašel <sup>1</sup>. I dnes postihuje především novorozence, objevuje se však i u dospělých <sup>2</sup>.

První písemné zmínky o černém kašli pocházejí z roku 1578 a popisují propuknutí epidemie v Paříži. Samotná bakterie, která způsobuje černý kašel, pak byla objevena v roce 1906 dvěma belgickými vědci, Julesem Bordetem a Octavem Gengouem. Právě po Julesi Bordetovi získala tato nově objevená bakterie své jméno – *Bordetella pertussis* <sup>1</sup>.

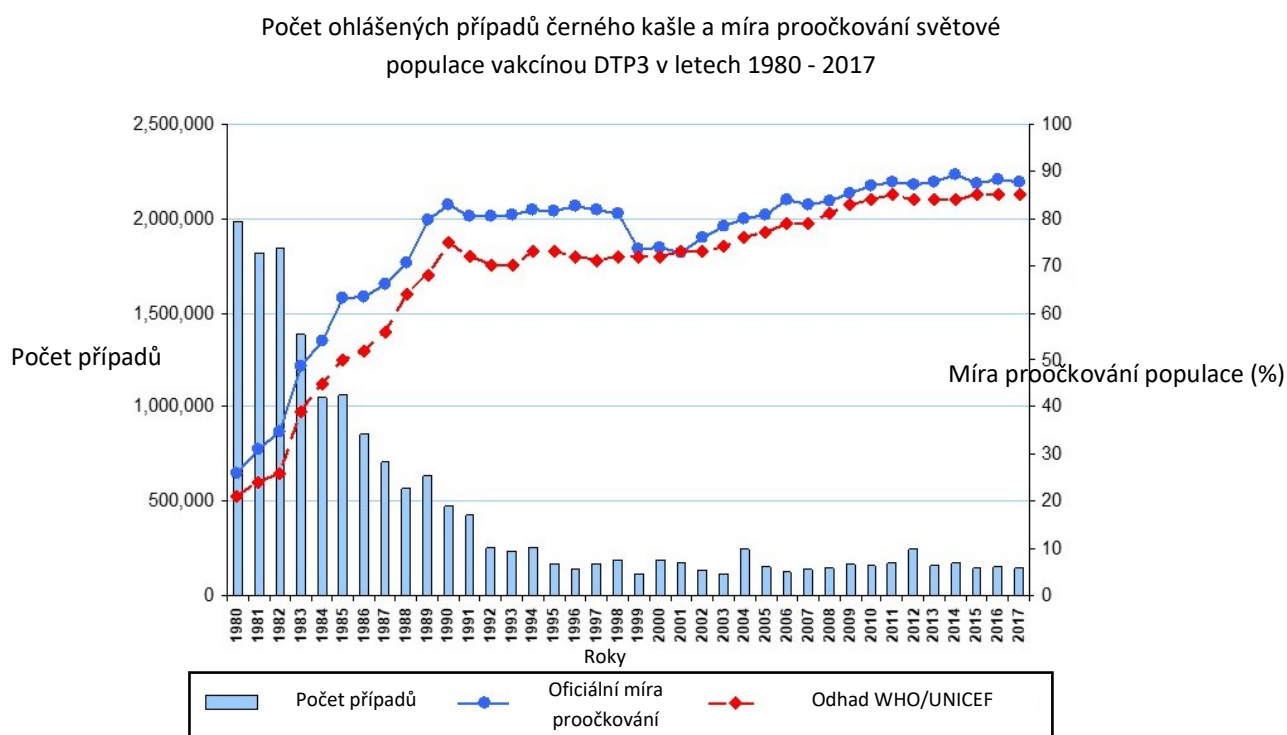
Izolování čisté bakteriální kultury bylo klíčovým krokem v boji proti černému kašli, následované snahou o vytvoření vakcíny. Prvním autorem vakcíny byl dánský lékař Thorvald Madsen. Ten svoji vakcínu testoval v roce 1925 na odlehlých Faerských ostrovech, které byly epidemií černého kašle zmítány. Jeho vakcínu pak ve 30. letech zdokonalili dva američtí vědci – Louis Sauer a především Pearl Kendrick, která stála u vytvoření kombinované vakcíny proti záškrtu, tetanu a černému kašli pod názvem DTP (z angl. „Diphtheria – Tetanus – Pertussis“). Tuto vakcínu pak v roce 1981 modifikoval japonský vědec Yuji Sato, použitím antigenů *B. pertussis* namísto celých inaktivovaných buněk. Vakcína nese označení DTaP Diphtheria, Tetanus, acellular Pertussis <sup>3</sup>.

Od zavedení vakcíny začaly stavy osob infikovaných černým kašlem ve světě prudce klesat. Odhad počtu nakažených z roku 1980 se pohybuje kolem 2 milionů jedinců, v polovině devadesátých let už však mezi jedním a dvěma sty tisíci (viz. Obr.č.1 – str.11) <sup>4</sup> a dodnes je tomu stejně. V nedávných letech ale nakažených začalo opět přibývat. Alarmujícím případem bylo propuknutí černého kašle v roce 2010 v Kalifornii, při kterém se nakazilo přes 9 000 lidí a deset dětí zemřelo. Důvodů opětovného rozšíření černého kašle může být řada, jednou z nich je fakt, že někteří rodiče odmítají své děti z různých důvodů proti černému kašli (i jiným nemocem) očkovat <sup>5</sup>. Dalšími faktory jsou také slábnutí imunity jedinců napříč celou společností (černý kašel dříve postihoval výhradně děti do 9 let věku, dnes však napadá i dospívající a dospělí, kteří pak fungují jako přenašeči) <sup>6</sup> a omezená doba působení vakcíny, která se odhaduje na 3 až 6 let <sup>7</sup>.

Důležitým faktorem opětovného rozšíření černého kašle je také nárůst rezistence kmenů *B. pertussis* vůči antibiotikům i acelulární vakcinaci. Výzkum UNSW (University of New South

Wales), který analyzoval 167 vzorků *B. pertussis* udává, že 98% z nich bylo rezistentních na erytromycin, který je nejčastěji používaným antibiotikem proti této bakterii <sup>8</sup>.

Vzrůstá i zastoupení bakterií, u nichž acelulární vakcinace může selhávat. Hlavními složkami acelulární vakcíny jsou především pertusový toxin (PT) a pertactin (PRT), dále pak vláknitý hemagglutinin (FHA, z angl. „filamentous hemagglutinin“) a fimbrie (FIM) <sup>9</sup>. Vakcinace využívající PRN má za následek selekční tlak, který favorizuje bakteriální kmeny schopné umlčet expresi PRN. Zároveň se rozšiřují bakterie se zvýšenou produkcí PT. Jedna z hypotéz tvrdí, že vyšší produkce PT, který má imunosupresivní účinky, způsobuje rychlejší šíření bakterie v lidské populaci. Výzkumy potvrzující tuto hypotézu však teprve probíhají <sup>10</sup>.



Source: WHO/IVB database, 2018  
194 WHO Member States.  
Data as of September 2018



**Obr.č.1** - Graf Světové zdravotnické organizace (WHO - World Health Organization) ze září 2018, popisující počet nakažených v uplynulých letech a míru proočkovaní populace vakcínou DTP3 (Diphteria – Tetanus – Pertussis, 3 dávky). Sloupce znázorňují počet nakažených černým kašlem, modrá linka udává oficiální procentuální zastoupení očkovaných jedinců, červená přerušovaná linka pak odhad reálného procentuálního zastoupení (převzato a upraveno z <sup>4</sup>).

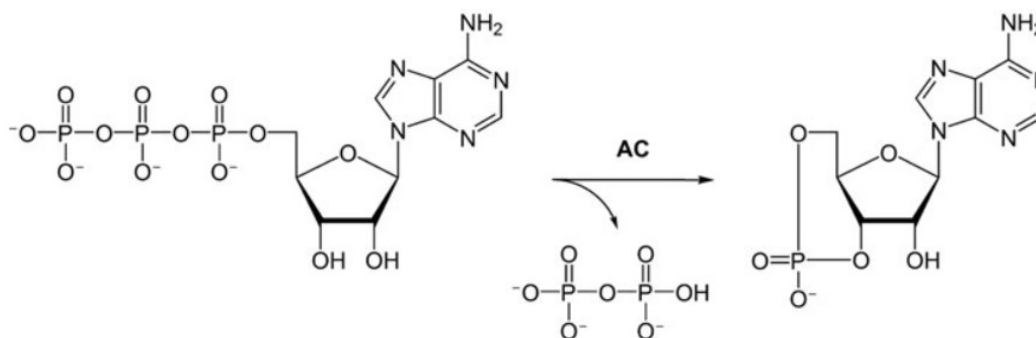
## 2.2 Bakterie *Bordetella pertussis*

Gramnegativní bakterie *Bordetella pertussis* kolonizuje především horní cesty dýchací, nasedá na cilie řasinkového epitelu a tento epitel ničí, aby nový prostor mohla kolonizovat. Využívá hned několika virulentních faktorů, např. pertusový toxin (zabraňuje aktivaci signálních proteinů v buňce), adenylátcyklasový toxin (vykazuje řadu zásadních funkcí pro kolonizaci hostitelského ekosystému, tomuto toxinu se v této práci dále věnujeme), nebo tracheální cytotoxin (poškozuje buňky řasinkového epitelu). Dalšími faktory, které zvyšují virulenci *B. pertussis* jsou proteinové filamenty na povrchu bakterie, pertactin, fimbrie nebo vláknitý hemagglutinin, které zprostředkovávají adhezi bakterie k buňkám řasinkového epitelu <sup>11</sup>.

Lidé jsou jediní hostitelé *B. pertussis* a k přenosu v populaci dochází kapénkovou infekcí <sup>12</sup>. Inkubační doba se pohybuje mezi 7 až 21 dny, samotné onemocnění trvá od 6 do 8 týdnů. V počáteční fázi se se dostávají projevy obyčejného nachlazení. Kašlání však přetrvává déle než dva týdny a oproti nachlazení dochází k záchvatům kašle nebo tzv. kokrhavému kašlání. To vše může být navíc doplněno zvracením nebo u kojenců apnoickou pauzou (vynecháním dechu na více než 20 vteřin) <sup>13</sup>.

## 2.3 Adenylátcyklázový toxin

Adenylátcyklázový toxin (ACT) je jedním z několika virulentních faktorů *B. pertussis*. Tento protein, zásadní pro kolonizaci lidského dýchacího ústrojí, byl identifikován již před řadou let. Je produkován virulentními bakteriemi, ze kterých je sekretován do mezibuněčného prostoru, odkud dále napadá cílové buňky hostitelského organismu. Po interakci s plasmatickou membránou cílové buňky dochází k řadě dějů na jejichž konci je dAC aktivována eukaryotním kalmodulem – transportním buněčným proteinem, jehož náplní je přenos vápenatých iontů uvnitř buňky (CaM, z angl. “ Calmodulin - CALcium MODULated proteIN“) <sup>14,15</sup>. Po aktivaci nekovalentní vazbou s CaM, zahájí ACT intenzivní syntézu 3',5'-cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) z buněčného adenosintrifosfátu (ATP) (viz. Obr.č.2 – str.13) <sup>13</sup>.



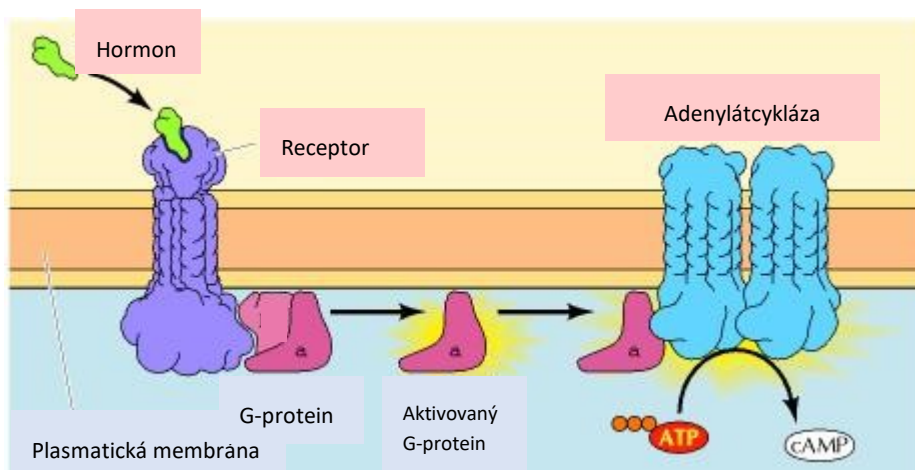
**Obr.č.2** – Schéma cyklizace ATP adenylátcyklázou (AC) <sup>16</sup>.

### 2.3.1 Přírozená role cAMP v buňce

Adenylátcykláza není unikátním enzymem *B. pertussis*, ale vyskytuje se přirozeně i v lidské buňce. Je součástí hormonálního systému, s funkcí tzv. efektoru – enzymu na vnitřní straně cytoplasmatické membrány, předávajícího dál signál, který doputoval v podobě hormonu extracelulárním prostorem k membránovému receptoru. Adenylátcykláza tvoří komplex spolu s hormonálním receptorem a tzv. G-proteinem <sup>17</sup>.

G-proteiny jsou membránové vícepodjednotkové proteiny, které na vnitřní straně membrány obsahují vazebné místo pro guanosintrifosfát (GTP). V normálním stavu váží G-proteiny GDP, dojde-li ale k navázání hormonu na receptor, dojde k nahrazení GDP molekulou GTP. Vazebné místo pro GTP, tzv.  $\alpha$ -podjednotka, funguje jako guanosin fosfatáza. Dochází k rozštěpení GTP, změně konformace G-proteinu a následné deaktivaci adenylátcyklázy (viz. Obr.č.3 – str.14). Jedná se o kontraregulační mechanismus, kterým se buněčný signální systém vrací do ustáleného stavu <sup>17</sup>.

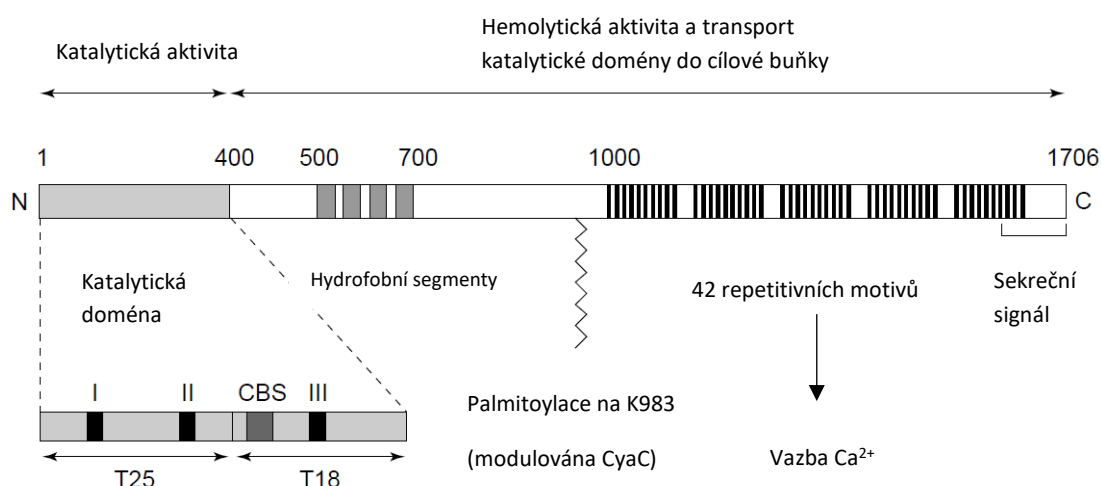
Adenylátcyklázou endogenně syntetizovaný cAMP je nedílnou součástí hormonální signalizace v organismu, kde funguje jako jeden z tzv. druhých posílů v intracelulární signalizaci. Jedná se o signální molekulu, která se uvnitř buňky váže především na kinázy a tím spouští nitrobuněčný signalizační systém fosforylační kaskády. Není ale jediným cyklickým signálním nukleotidem, byly objeveny i signální systémy využívající cGMP. Při kritickém zvýšení koncentrace cAMP v buňce dochází k narušení buněčné signalizace a tento stav následně vyústí v apoptózu <sup>17</sup>.



**Obr.č.3** – Mechanismus hormonální signalizace za účasti adenylátcyklázy. Po navázání hormonu na receptor dojde k aktivaci G-proteinu, který ovlivní aktivitu adenylátcyklázy v buněčné membráně (převzato a upraveno z <sup>18</sup>).

## 2.3.2 Struktura ACT

ACT je protein, který ve své primární sekvenci obsahuje 1706 aminokyselin a můžeme u něj identifikovat minimálně dvě různé domény (tzv. bifunkční enzym). První z nich je katalytická adenylátcyklázová doména (dAC), která je zodpovědná za výše zmíněnou syntézu cAMP z ATP a následnou apoptózu napadené eukaryotní buňky. Druhou doménou je doména vykazující hemolytickou aktivitu <sup>14</sup>.



**Obr.č.4** – Vizualizace řetězce proteinu ACT (převzato a upraveno z <sup>14</sup>). Vyznačená je katalytická (adenylátcyklázová) doména nacházející se v úseku prvních čtyř set aminokyselin od N-konce. V levé spodní části obrázku jsou přiblíženy její dvě subdomény T25 a T18, v jejichž rámci jsou vyznačena významná katalytická místa I,II,III a CBS (z angl. “CaM binding site” – vazebné místo CaM). Dále je zde zobrazena hemolytická doména, která sahá až k C-konci proteinu. Znáznorněna je i palmitoylace Lysinu983 a 42 repetitivních sekvencí bohatých na glycin, které váží Ca<sup>2+</sup> <sup>14,19</sup>.

ACT je nejprve syntetizován v neaktivní formě proenzymu. Aktivován je až připojením kyseliny palmitové na Lysin 983, tzv. palmitoylací <sup>19</sup>.

Katalytická doména, schopná cyklizace ATP, se nachází na N-konci proteinu, tvoří ji přibližně prvních 400 aminokyselin. Sama o sobě má dAC pouze malou enzymovou aktivitu, ta se ale zvyšuje interakcí domény s buněčným CaM. CaM má v běžném fungování buňky roli modulátoru dalších proteinů, které ho využívají jako vápníkový sensor, který může dál přenášet signál a ovlivňovat aktivitu mnoha proteinů. Mění svou konformaci po připojení  $\text{Ca}^{2+}$  iontu, a právě v takové konformaci je schopen se na další proteiny vázat a ovlivňovat jejich fungování <sup>20</sup>. Tím dochází k přenosu signálu na základě koncentrace vápníku, který v buňce funguje, podobně jako cAMP, coby signální prvek zapojený například v hormonální signalizaci <sup>15,17</sup>. Jedním z proteinů, jejichž funkce je závislá na CaM je i dAC. CaM se na ni nekovalentně připojuje s vysokou afinitou a stimuluje aktivitu enzymu víc jak tisíckrát. Výsledkem je intenzivní katalytická aktivita dAC ( $k_{cat} = 2000 \cdot \text{s}^{-1}$ ) <sup>14</sup>.

V rámci katalytické domény lze rozlišit ještě dvě subdomény. První z nich je doména T25 (tvořená z aminokyselin 1 – 224), druhou subdoménou je T18 (tvořená z aminokyselin 225 - 399). Subdoména T25 je zodpovědná za katalytickou aktivitu dAC, subdoména T18 je hlavním místem silné nekovalentní interakce s CaM. I po narušení primární struktury dAC částečnou proteolýzou trypsinem, jsou k sobě podjednotky T18 a T25 nekovalentně silně vázány a dokonce jsou schopny se s CaM pojit v jeden katalyticky funkční celek <sup>14</sup>.

### 2.3.3 RTX proteiny

Hemolytická doména vykazuje některé strukturní charakteristiky, na jejichž základě je ACT řazen mezi tzv. RTX proteiny (z angl. „Repeats in ToXin“). Jde o proteiny na jejichž C-konci se nachází specifické repetitivní signální sekvence aminokyselin. Jedná se o velkou rodinu proteinů produkovaných gram-negativními bakteriemi, například *E. coli*, *Vibrio species* nebo právě *B. pertussis*.

RTX proteiny mají několik společných znaků. Tím hlavním je, že obsahují C-terminální doménu schopnou nekovalentně vázat vápenaté ionty z okolí a následně měnit svou konformaci. Tato doména se vždy skládá z repetitivních sekvencí schopných vazby  $\text{Ca}^{2+}$ , bohatých především na aminokyseliny glycin. Universální sekvence pro řadu RTX proteinů má pořadí aminokyselin GGXGXD. U ACT odpovídá tato sekvence pořadí aminokyselin

GGXG(N/D)D. Počet těchto sekvencí se u jednotlivých proteinů liší, pohybuje se v rozmezí přibližně 10 až 40 opakování. Dalšími společnými znaky RTX proteinů je transport z bakteriálních buněk systémem T1 (T1SS) a pro funkci nezbytná posttranslační modifikace (především připojení mastných kyselin). Úlohou většiny RTX proteinů je po sekreci z bakterie pronikat přes membrány hostitelských buněk a podílet se na jejich eliminaci <sup>21</sup>.

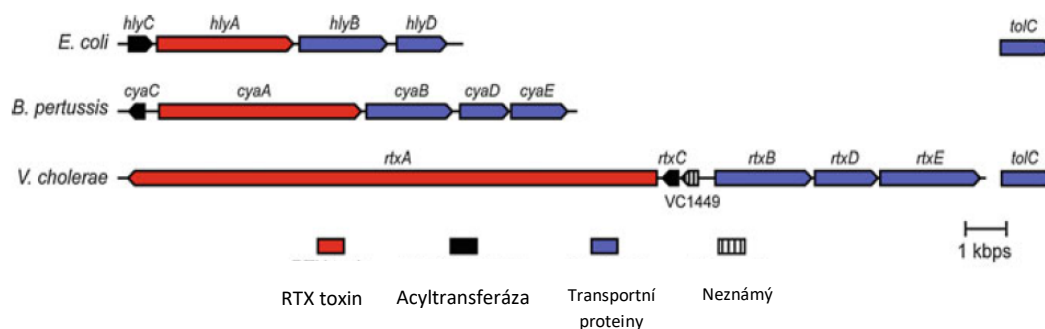


**Obr.č.5** – Prostorový model ACT. Běžově je zvýrazněna dAC, modře je zvýrazněn CaM. Zeleně jsou zvýrazněny vápenaté kationty. Převzato z <sup>22</sup>, PDB kód 2COL.

### 2.3.4 Operon ACT a mechanismus sekrece

Genetickým podkladem pro proteosyntézu RTX proteinů a pomocného proteinového aparátu je operon složený ze 4 genů (označovaných jako *rtxA/B/C/D*). U jednotlivých RTX proteinů se struktura kódujícího operonu drobně odlišuje, celkové schéma ale zůstává zachováno. Toto schéma je vidět na Obr.č.6 - str.17. Samotný virulentní toxin je kódován genem *rtxA* (u ACT *B. pertussis* genem *cyaA*).





**Obr.č.6** – Operony kódující toxiny a pomocný proteinový aparát *E. coli*, *B. pertussis* a *V. cholerae*. Černě jsou znázorněny geny kódující acyltransferázu, modře geny kódující pomocné transportní proteiny, pruhované geny, jejichž funkce není známa a červeně geny, které kódují samotný RTX protein (převzato a upraveno z <sup>21</sup>).

Jak již bylo zmíněno dříve, RTX proteiny vyžadují posttranslační připojení mastných kyselin (většinou kyseliny palmitové) aby se staly biologicky aktivními toxiny. To je možné díky produktu genu *rtxC*, který je acyl-transferázou, která využívá acyl navázaný na acyl přenašečovém proteinu (acyl-ACP) jako donor řetězce mastné kyseliny a tento řetězec následně kovalentně připojuje na cílový RTX protein, čímž ho aktivuje <sup>21</sup>.

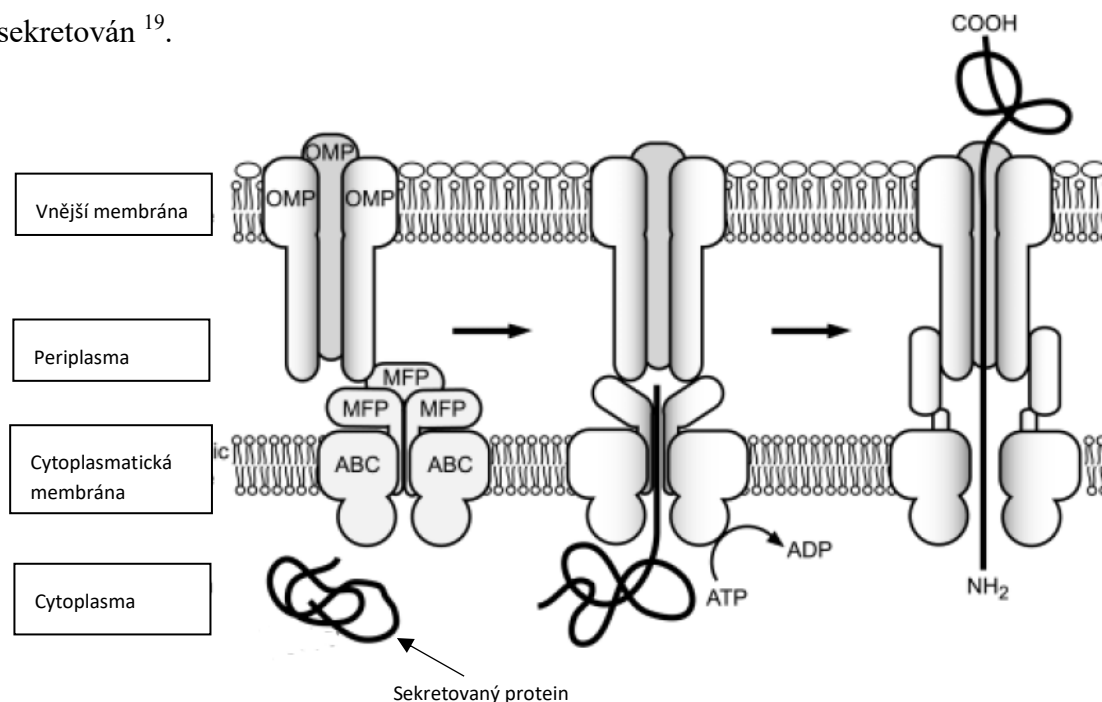
Po aktivaci acyl-transferázou, jsou RTX proteiny přímo transportovány k povrchu vnější bakteriální membrány a sekretovány do extracelulárního prostoru. To se děje za pomoci transportních proteinů, kódovaných geny *rtxB/D/E*, které dohromady tvoří sekreční systém T1 (T1SS).

*RtxB* geny kódují proteiny z rodiny ABC – transportních proteinů (z angl. “ATP- Binding Cassete”), které jsou integrovány do vnitřní bakteriální cytoplasmatické membrány.

Transkripty genů *RtxD* jsou členy rodiny fúzních proteinů, které sahají z cytoplasmatické membrány až do periplasmatického prostoru. *RtxE* gen je většinou umístěn mimo genový *rtx* lokus. Kóduje část T1SS aparátu umístěnou na vnější membráně bakterie <sup>21</sup>.

Sekreční systém T1, schopný transportu proteinů z buňky do extracelulárního prostoru, je označován jako „tunnel-channel assembly“ a jeho složení, umístění a funkce je schematicky znázorněna na Obr.č.7, str.18. Celý proteinový komplex T1SS se skládá ze 3 specifických proteinů. Prvním z nich je Exportní protein na vnitřní straně membrány s ATPázovou doménou. Další součástí T1SS je Membránový fúzní protein (MFP, z angl. „Membrane Fusion Protein“). Ten se rozprostírá od vnitřní membrány do periplasmatu a zprostředkovává kontakt mezi ABC exportérem a Vnější membránovým proteinem (OMP, z angl. „Outer membrane protein“). OMP je poslední součástí sekrečního systému T1. Tento proteinový trimer se nachází na vnější vrstvě cytoplasmatické membrány. Po rozeznání rozpoznávací repetitivní

sekvence RTX proteinu, dochází ke kontaktu proteinů ABC a MFP (nacházejících se na vnitřní straně membrány) s trimerním proteinem OMP (na vnější straně membrány). Konformace proteinového komplexu se mění, vzniká „tunnel-channel assembly“ přes celou gram-negativní membránu a RTX protein je transportován na vnější povrch bakterie a poté sekretován<sup>19</sup>.



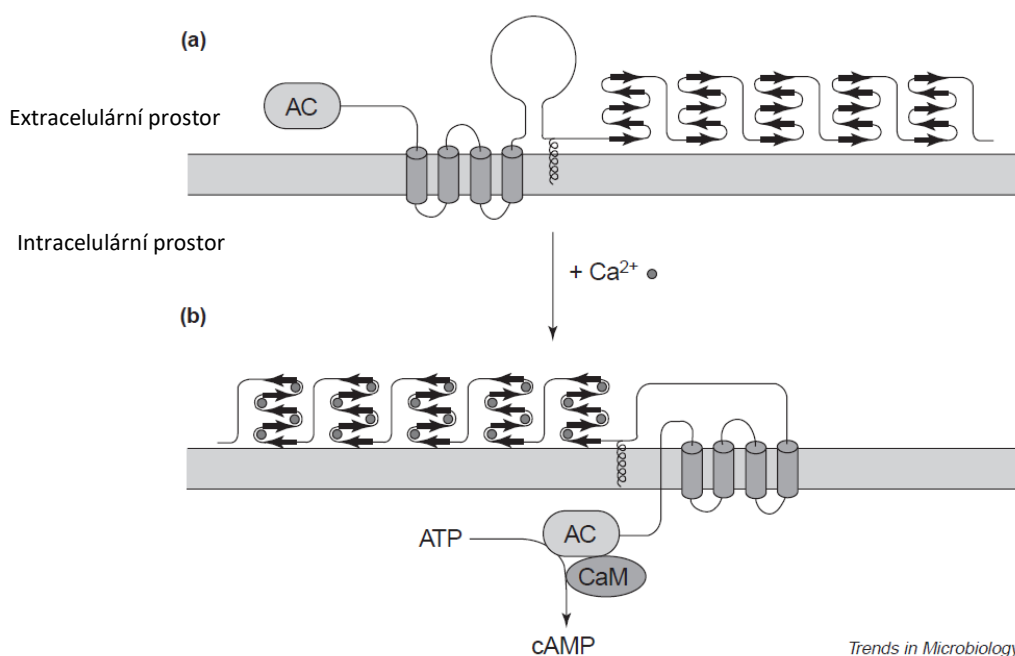
**Obr.č. 7** – Znáznornění proteinového komplexu TISS. (převzato a upraveno z<sup>19</sup>). Vyznačené jsou jednotlivé proteiny sekrečního systému T1 (OMP, MFP, ABC). Černě je vyznačen sekretovaný protein, který je za hydrolyzy ATP transportován z buňky přes obě membrány C-koncem napřed.

### 2.3.5 Mechanismus vstupu dAC do hostitelské buňky

Po sekreci do extracelulárního prostoru je na řadě proces vstupu ACT, resp. dAC, do hostitelské buňky, a to s jasným cílem – rychle syntetizovat nadkritické množství cAMP, narušit molekulární signalizaci hostitele a vyvolat apoptózu. ACT vstupuje do různých typů buněk procesem zvaným internalizace nebo intoxikace. Podstatou tohoto procesu je, že katalytická doména je do hostitelské buňky translokována přes plasmatickou membránu přímo, nevstupuje prostřednictvím endosomů nebo jiných membránových útvarů. Přesný průběh mechanismu translokace dAC přes membránu hostitelské buňky není dnes ještě dopodrobna prozkoumaný, bylo však zjištěno, že se sestává minimálně ze dvou kroků, jak ilustruje Obr.č.8, str.19<sup>14</sup>.

V prvním kroku se ACT připojí k membráně hostitelské buňky, pravděpodobně ke gangliosidům. To je umožněno díky předchozí palmitoylaci ACT na Lysinu 983 – zbytky mastných kyselin jsou hydrofobní, a proto pronikají snadno do hydrofobního prostředí membrány. V případě erytrocytů může nasednutí ACT na membránu eventuálně vyústit rovnou v lýzi buňky a to díky aktivitě pórovorné (hemolytické) domény proteinu <sup>19</sup>.

Druhým krokem je sama translokace katalytické domény dovnitř buňky. Tento proces je závislý na membránovém potenciálu, koncentraci vápenatých iontů a teplotě okolí (probíhá pouze při teplotě prostředí vyšší než 15°C). Hlavní roli v procesu translokace AC domény hrají opět C-terminální repetitivní sekvence. Ty díky svému aminokyselinovému složení nekovalentně váží vápenaté ionty z okolí, následkem čehož dochází ke změně konformace celého proteinu a translokaci katalytické domény přes membránu dovnitř hostitelské buňky. Důležitou hybnou silou translokace přes membránu je pravděpodobně elektrostatická interakce mezi elektrostatickým polem na plasmatické membráně a nábojem repetitivních sekvencí ACT <sup>14</sup>.



*Trends in Microbiology*

**Obr.č.8** – Mechanismus translokace ACT přes hostitelskou membránu. a) V prostředí s nízkou molární koncentrací vápenatých kationtů (<0,1mM) hydrofobní úseky (šedé válečky) a řetězec kys. palmitové (černá šroubovice) pronikají do cytoplasmatické membrány. b) V prostředí s vyšší molární koncentrací (>0,1mM) se vápenaté kationty (šedé kroužky) naváží na repetitivní sekvence. To spustí konformační změnu ACT a tedy translokaci katalytické domény do nitra hostitelské buňky. Po nekovalentní interakci s CaM se spustí syntéza cAMP.<sup>14</sup>

### 2.3.6 Další vliv ACT na signalizaci v buňce

Hlavními signalizačními kanály uvnitř buňky jsou fosforylační kaskády. Do tohoto systému ACT *B. pertusis* zasahuje nadměrnou syntézou cAMP. Kromě této signalizace funguje v buňce předávání signálu proteolýzou, a i na tento systém intracelulární signalizace ACT útočí. ACT se řadí mezi tzv. pórtvorné toxiny (PFT, z angl. „Pore-Forming Toxins“). Tyto proteiny jsou důležitým virulentním faktorem mnoha bakterií. Jsou sekretovány do extracelulárního prostoru a pronikají k membránám hostitelských buněk. Na ně se následně váží pomocí specifických receptorů, podstupují konformační změnu, pronikají dovnitř cytoplasmatické membrány a v ní vytvoří pór. Pór v membráně je pro buňku vážným poškozením. Jeho následkem dochází především k úniku  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  a ATP <sup>23</sup>.

Reakce buňky na dramatické snížení koncentrace draselných nebo vápenatých kationtů v buňce může být různá. Pokles koncentrace draselných kationtů spouští syntézu NLRP3 inflammasomu. Jedná se o proteinový komplex ovlivňující aktivaci kaspázy 1, proteázy zapojené do modulace zánětlivých procesů v buňce. Pokles koncentrace vápenatých iontů spouští především expresi Calpainu, proteázy, která se účastní apoptózy a degradace intracelulárních komponent. Velký pokles v buněčné koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  a ATP může mít za následek rovněž narušení mitochondriální aktivity a nekrózu buňky <sup>23</sup>.

### 2.3.7 Využití ACT ve výzkumu a klinické praxi

V dnešní době je dAC standardně využívána jako značící/signalizační protein pro sledování translokace proteinů do cytosolu eukaryotických buněk. Jak již bylo zmíněno, samotná dAC bez CaM má pouze malou enzymovou aktivitu. Gram-negativní bakterie CaM ani jeho homology neprodukují a enzym je proto uvnitř bakteriální buňky téměř neúčinný. Pro značení translokace proteinů do buňky je dAC uměle spojen s požadovaným proteinem a sekretován sekrečním systémem T3, pomocí něž se dostane do hostitelské eukaryotní buňky. Tam již v důsledku přítomnosti CaM aktivita dAC vzroste více jak tisíckrát. Díky vzrůstu koncentrace cAMP je pak možno usuzovat o transportu obou proteinů (jak dAC tak pro translokaci požadovaného proteinu) do nitra buňky.

Dalším využitím dAC je sledování protein-proteinových interakcí. Zde je využito faktu, že aby se projevovala, byť malá aktivita dAC bez přítomnosti CaM, musí docházet k interakci

mezi oběma částmi této domény – T18 a T25. Tyto sekvenční úseky jsou tedy exprimovány zvlášť a na každý z nich jsou uměle připojeny další proteiny nebo peptidy, jejichž interakce je dále studována. Pokud dojde k interakci obou studovaných peptidů/proteinů, dochází k přiblížení T18 a T25 a začne syntéza cAMP. Ke sledování průběhu této říze je využito vlivu cAMP na transkripci proteinů – i malá koncentrace cAMP v buňce vede ke spuštění transkripce genů (většinou v bakterii *E. coli*, kde se spustí exprese genů zapojených do katabolismu laktózy a maltózy) <sup>19</sup>.

Posledním využitím ACT je transport epitopů T-buněk do cytoplasmy a endoplasmatického retikula a ovlivnění hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z angl. “Major Histocompatibility Complex”). Experimentálně bylo prokázáno, že rekombinantní ACT přenesl CD8+ epitop T-buňky navázaný uvnitř své katalytické domény (mezi aminokyselinovými zbytky 224 a 225). Takto upravený ACT byl vpraven do těla laboratorní myši, kde za účasti vazby na antigen prezentujících buněk, dostal do cytosolu hostitelských buněk svoji katalytickou doménu. Intracelulární degradací pomocí proteasomu byla dAC rozštěpena, epitopy T-buněk uvolněny a transportovány ATP-dependentními transportními proteiny do endoplasmatického retikula buňky. V endoplasmatickém retikulu se epitopy asociovaly s MHC glykoproteiny I.třídy a  $\beta_2$ -mikroglobulinem. Po transportu na povrch buňky, spouštěl komplex epitopu, MHC glykoproteinu I.třídy a  $\beta_2$ -mikroglobulinu proliferaci cytotoxických T-lymfocytů <sup>14</sup>.

## 2.4 Metody proteinové analýzy

Při analýze proteinů se uplatňují dva přístupy. Prvním z nich je tzv. „Top-down“, při kterém jsou proteiny nejprve jednotlivě separovány ze směsi, následně proteolyticky štěpeny a jejich fragmenty dále analyzovány hmotnostní spektrometrií nejprve s nízkým (LC-MS) a poté s vysokým prostorovým rozlišením (MS/MS). Druhým je tzv. „Bottom-up“, při kterém je směs proteinů rovnou separována pomocí MS, vybraný druh molekuly přímo fragmentován bez předchozí protelýzy a takto jsou analyzovány fragmenty všech proteinů hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením.

Pro tuto práci jsme zvolili „Top-down“ přístup. Ze směsi exprimovaných proteinů jsme nejprve žádaný protein izolovali pomocí afinitní chromatografie, provedli síťovací experiment s interakčním partnerem (CaM) a produkty charakterizovali s ohledem na molekulovou

hmotnost pomocí SDS-PAGE (z angl. „Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Identifikované nově vzniklé proteinové proužky jsme analyzovali MALDI-TOF MS po předchozí proteolýze.

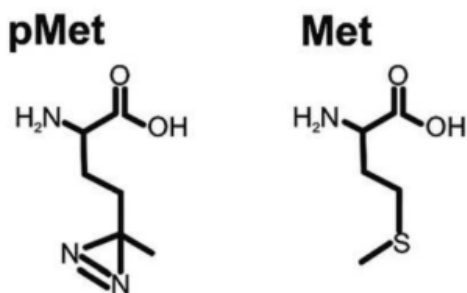
## 2.5 Metody zkoumání protein-proteinových interakcí

V této práci jsme použili kombinaci dvou metod, pomocí kterých jsme hledali vazebné místo CaM na dAC. Jedná se o metody fotochemického zesíťení (PIXL, z angl. „Photo Induced Cross Linking“) a hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. „Mass Spectrometry“).

### 2.5.1 Fotochemické zesíťení – PIXL

Fotochemické zesíťení navazuje na metodu chemického zesíťení. Umožňuje studovat vzájemné proteinové interakce na základě kovalentního propojení proteinů, například přes krátký molekulární řetězec - tzv. síťovací činidlo. Molekula síťovacího činidla obsahuje obecně dvě reaktivní skupiny spojené krátkým řetězcem (tzv. raménkem), které se váže na funkční skupiny povrchových aminokyselin a propojuje proteiny v místě, kde by docházelo k jejich nekovalentní interakci. Známe ale i síťovací činidla, která nekládají raménko mezi blízké aminokyselinové řetězce, tzv. „zero-length XL“, např. ve vodě rozpustný karbodiimid EDC <sup>28</sup>.

Cílem této metody je vytvořit novou kovalentní vazbu v místě nekovalentní interakce dvou proteinů, aby propojení vydrželo používané analytické metody, např. MS. V případě PIXL používaný foto-Methionin (pM) je fotoreaktivní strukturní analog methioninu, který v postranním řetězci obsahuje diazirinový kruh, jenž je umístěn tak aby napodoboval atom síry (viz. Obr.č.9 – str. 23) <sup>28</sup>.



**Obr.č.9** – vzorce foto-Methioninu (pM) a methioninu (Met) (převzato a upraveno z <sup>28</sup>).

Po fotoaktivaci UV světlem, dojde k uvolnění molekuly  $N_2$  z diazirinového kruhu a zároveň ke vzniku karbaniontu na postranním řetězci aminokyseliny. Jelikož karbaniont je velmi reaktivní, bude se snažit co nejrychleji sdílet nestabilní nadbytek elektronů: vznikem kovalentní vazby s dalším atomem ve vzdálenosti přibližně 5 Å nebo terminací za vzniku dvojné vazby<sup>28</sup>.

Tímto principem jsme, po inkorporování pM do primární struktury proteinu, schopni provést provázání dvou proteinů kovalentní vazbou, pokud je pM v primární sekvenci proteinu v pozici aminokyseliny, která se podílí na kontaktu s druhým interagujícím proteinem. Po následné detekci proteinového proužku odpovídajícího mobilitou v gelu SDS-PAGE heterodimeru obou interagujících proteinů a štěpení kovalentně vázaných proteinů proteázou v gelu, je schopná MS určit místo vytvoření kovalentní vazby v oblasti protein-proteinové interakce získáním signálů  $m/z$  peptidové mapy obou proteinů. V té je třeba identifikovat kovalentně propojené peptidy (jeden s pM od studovaného proteinu a druhý od interagujícího partnera). Tento princip odpovídá zmíněnému proteomickému přístupu „Top-down“.

## 2.5.2 Hmotnostní spektrometrie

Analytická metoda hmotnostní spektrometrie (MS) má široké využití v různých biochemických oblastech výzkumu, především v proteomice, výzkumu metabolismu, výzkumu biopolymerů apod. Hmotnostní spektrometrie se dále uplatňuje například v analýze znečištění životního prostředí, kontrole potravin nebo ve forenzních vědách.

Jejími hlavními přednostmi jsou především velká citlivost, vysoká selektivita a rychlost detekce analytu.

Principem této metody je pohyb a interakce nabitých částic s magnetickým nebo elektrickým polem ve vakuu analyzátoru MS s následným rozdělením na základě rozdílného poměru hmotnosti a přeneseného náboje ( $m/z$ ). Většina iontů je pozitivně nabitá, a to nábojem odpovídající ztrátě jednoho elektronu z elektronového obalu molekuly nebo přijetí  $H^+$  iontu, podle druhu použitého ionizačního zdroje. U velkých molekul pak může docházet i ke ztrátě více než jednoho elektronu či přijetí více  $H^+$  iontů<sup>24</sup>.

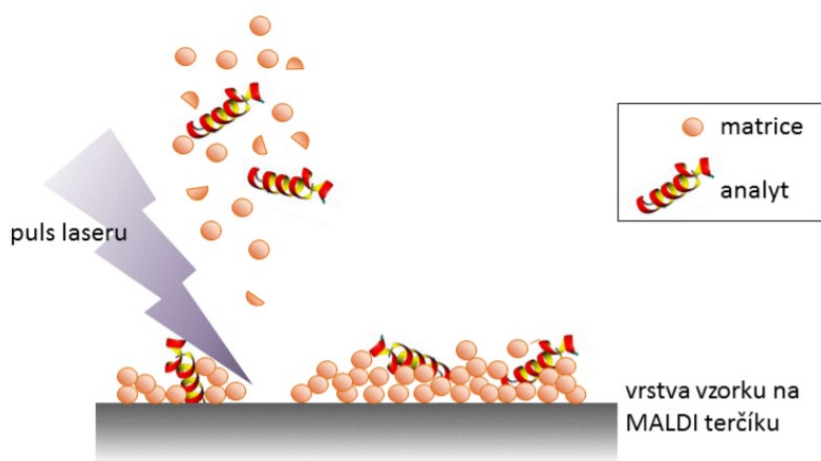
K popisu hmotnosti analytu slouží atomová hmotnostní jednotka nebo také jednotka dalton (Da), jako násobek hmotnosti této jednotky.

Jednotka Da je definována takto:

$$1 \text{ u} = 1\text{Da} = 1,660540 \cdot 10^{-27} \text{ kg} \quad (1)$$

Analyzované částice musí být nejprve ionizovány v ionizačním zdroji. Způsobů ionizace molekul analytu je celá řada, nicméně pro biomolekuly v biochemii a mikrobiologii se využívá nejčastěji ionizace MALDI (z angl. „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization“) a ESI (z angl. „Electrospray Ionization“). Metoda MALDI je kromě svojí efektivity a rychlosti vyhledávána i pro jednoduchou přípravu vzorků k analýze a odolnost měření vůči kontaminaci solemi, pufrů apod.<sup>24</sup>.

Ionizace MALDI přímo vychází z metody Desorpce/Ionizace Laserem (LDI, z angl. Laser Desorption Ionization). Jedná se o ionizaci částic o větší molekulové hmotnosti pomocí laseru. Pulsy paprsku laseru jsou zaměřeny na vzorek analytu alokovaný většinou na pevném povrchu. Tyto pulsy v krátkém časovém rozmezí předají zasaženým analyzovaným molekulám adekvátní energii k jejich excitování a tím je ionizují. Laser zároveň desorbuje molekuly analytu z podkladového povrchu, vytvoří mikroplasmu iontů a neutrálních molekul, které mezi sebou mohou ve vzniklém oblaku plynné fáze interagovat a pokračovat v průletu do analyzátoru. Při použití metody LDI ale hrozí nežádoucí fragmentace makromolekul. Metoda MALDI tedy ionizuje analyt nepřímou přes matici (viz. Obr.č.10 – str.25), obvykle organickou kyselinu schopnou absorbovat energii laseru, a předávat ji analytu. Proto je nutné zvolit matici, která má absorpční maximum blízké vlnové délce laseru. Pulsem laseru je zároveň matrice i s analytem desorbována a ve vakuu dochází k přenosu  $\text{H}^+$  iontu na analyt<sup>24</sup>.

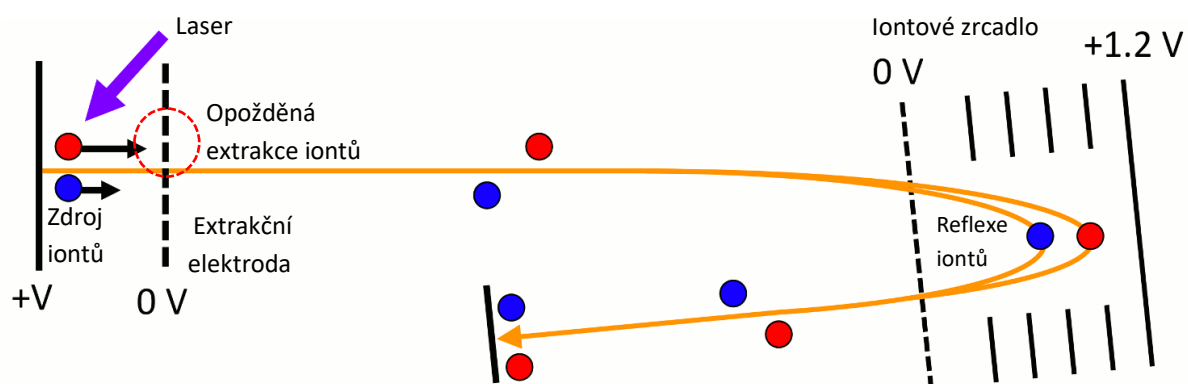


**Obr.č.10** – Schéma fungování MALDI<sup>25</sup>.



Nabité molekuly pokračují k TOF analyzátoru (z angl. „Time Of Flight“), který separuje ionty na základě jejich rychlosti průletu oblastí letové trubice. Všechny ionty získají na začátku analyzátoru přibližně stejnou kinetickou energii, nemají ale stejnou hmotnost. Proto se v TOF analyzátoru rozdělí na základě jejich rychlostí. Poměry  $m/z$  jsou určovány podle měření času, za jaký daný ion proletí letovou trubicí a dopadne na detektor <sup>26</sup>.

TOF analyzátor používaný v této práci využíval pro zvýšení rozlišení tzv. iontové zrcadlo. účelem iontového zrcadla je sjednotit kinetickou energii částic o stejném  $m/z$ . Jedná se o sérii rovnoměrně rozmístěných elektrod, které v analyzátoru vytváří oblast s potenciálovým gradientem. Částice s vyšší potenciální energií – resp. větší rychlostí, proniknou do pole s potenciálovým gradientem hlouběji. Stráví tak delší čas uvnitř iontového zrcadla a na detektor dopadnou ve stejný čas jako pomalejší částice o stejném  $m/z$  (viz. Obr.č.11 – str. 25). Tím dochází ke zvýšení rozlišení <sup>26</sup>.



**Obr. č. 11** – Schéma MALDI-TOF hmotnostního spektrometru využívajícího metodu iontové fokusace pomocí iontového zrcadla (převzato a upraveno z <sup>26</sup>).

### 3 Cíle práce

Cílem práce je určit polohu místa nekovalentní interakce dAC a CaM. Očekáváme, že toto místo se na dAC nachází v blízkosti tryptofanu 242<sup>27</sup>. To nám umožňuje vyzkoušet metodu PIXL. Chceme provést expresi mutantního proteinu, který bude mít v primární struktuře v blízkosti předpokládaného vazebného místa zabudovaný pM. Po jeho aktivaci UV světlem bychom mohli dosáhnout fotochemického zesítnění dAC s CaM a po následné proteolýze určit přesnou polohu vazebného místa pomocí MS.

Postup práce můžeme rozdělit na několik dílčích podcílů:

- Exprese, izolace a charakterizace dAC, která v primární struktuře obsahuje místo Leucinu 240 pM (dACL240pM). Využijeme faktu, že postranní řetězec pM je stejně jako postranní řetězec leucinu hydrofobní a bude pravděpodobně docházet k hydrofobní interakci s postranními řetězci CaM. Celkem provedeme tyto tři kroky:
  - Transformace buněk *E. coli* B834
  - Exprese proteinu dACL240 s pM v minerálním médiu
  - Izolace proteinu (afinitní chromatografií) a jeho charakterizace
- Studium protein-proteinové interakce dACL240pM s CaM pomocí kombinace metod PIXL a MS
- Na základě výsledků této práce chceme identifikovat, nebo alespoň zúžit místo interakce dAC s CaM. Budoucí výzkum by mohl spočívat v expresi mutantního proteinu s inkorporovaným pM na pozici tryptofanu 242, či jiné aminokyseliny v jeho blízkosti, tak aby došlo k fotochemickému zesítnění obou proteinů *in vivo*.

## 4 Materiál

### 4.1 Chemikálie

1,4-dithiothreitol (Roth)

Acetonitril HPLC grade (Merck)

Adenosintrifosfát (Serva)

Akrylamid (Roth)

Ampicilin, sodná sůl (Roth)

ArgC endoproteáza, izolovaná z bakterie *Clostridium histolyticum* (Roche Diagnostics)

Bis-akrylamid (Serva)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (Fluka)

$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (LACHEMA)

Coomassie Brilliant Blue-R250 (Sigma Aldrich)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (LACHEMA, Sigma Aldrich)

Dodecylsulfát sodný (Sigma Aldrich)

Ethylendiamintetraoctová kyselina (Fluka)

Ethylmorfulin (Fluka)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich)

Glukosa (Sigma Aldrich)

$\text{H}_3\text{BO}_3$  (LACHEMA)

Hovězí sérový albumin (Sigma Aldrich)

Hydroxid sodný (PENTA)

Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiopyranogalaktosid (Sigma Aldrich)

Kalmodulin, izolovaný z hovězího mozku (Sigma Aldrich)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lach-Ner)

Kvasničný extrakt (OXOID)

Kyselina bicinchoninová (BCA solution, Sigma Aldrich)

L-Fenylalanin (LACHEMA)

L-Isoleucin (Sigma Aldrich)

L-Leucin (United States Biochemical Corporation)

L-Lysin (Sigma Aldrich)

L-foto-Methionin (Thermo Scientific) (pM)

L-Threonin (United States Biochemical Corporation)

L-Valin (United States Biochemical Corporation)

Methanol HPLC grade (Merck)

MgCl<sub>2</sub> (LACHEMA)

MgSO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich)

MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O (LACHEMA, Merck)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (PENTA)

NaCl (Fluka)

Peroxodisíran amonný (Sigma Aldrich)

Precision Plus Protein Dual Color Standarts (BioRad)

Sacharóza (Lach-Ner)

Směs inhibitorů proteáz, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-free (Roche Diagnostics)

Tetramethylethyldiamin (Serva)

Thiamin hydrochlorid (Sigma Aldrich)

Trifluoroctová kyselina (Sigma Aldrich)

TrizmaTH base (Sigma Aldrich)

Trypsin, (Sequencing Grade Modified Trypsin) (Promega)

Trypton (OXOID)

Voda HPLC grade (Merck)

ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Fluka)

α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (Bruker Daltonics)

## 4.2 Bakteriální kmeny

*E. coli* B834 (Novagen<sup>TH</sup>)

## 4.3 Přístroje

Centrifuga Hettich Zentrifugen Universal 320 R

Elektrický zdroj Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150 (Pharmacia)

Elektroforetické souprava Hoefer<sup>TH</sup> Dual Gel Caster

Fotolyzační xenonová UV lampa Oriel Instruments 60100

Inkubátor Ultimate Dry Bath Incubator

Laboratorní váhy OHAUS Discovery

MALDI-TOF/TOF Ultra FLEX III (Bruker Daltonics)

Pipety Eppendorf, Pipetman, Gilson

Předvážky OHAUS Scout<sup>TH</sup> Pro

Pumpa Gilson Minipuls evolution

Pumpa Peristaltic pump S32, Labimex service

Sběrač frakcí Fraction Collector Frac-100

Schoeller IKA KS 4000

Stolní centrifuga Eppendorf F45

Sonikátor Bandelin Sonopuls

Sonikátor Elma<sup>TH</sup> ECB

Spektrofotometr DeNovix DS-11+ Spectrophotometer

Stolní minicentrifuga Eppendorf F-45-12-11

Vakuový rotační koncentrátor LABCONCO CentriVap micro IR

## 4.4 Materiál

Koncentrátor Amicon Ultra s membránou s „cut off“ 10 kDa (Millipore)

Nosič Chitin-Sepharosa S6651S (New England Biolabs)

QIAprep<sup>TH</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen)

## 5 Metody

### 5.1 Transformace buněk *E. coli* B834

Alikvot 50  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli* B834 byl smíchán s 1  $\mu$ l plasmidu o koncentraci 50 - 100  $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$  (nesoucího rezistenci na ampicilin a genetický templát pro expresi konstruktu dACL240M se záměnou Leucinu v pozici 240 za Methionin). Směs byla inkubována na ledu po 20 minut. Po skončení inkubace byl proveden tzv. teplotní šok, a to nejprve umístěním směsi buněk a plasmidu na 90 s do 42°C a opětovnou inkubací 20 minut na ledu. Poté bylo ke směsi přidáno 0,5 ml SOC media (složení viz Tab.č.1), promícháno a inkubováno 90 minut na třepačce (Schoeller IKA KS 4000) při 37°C a 200 RPM. Celá vzniklá buněčná kultura byla vyseta na agarosovou plotnu o koncentraci ampicilinu 0,3 mM. Agarosová plotna byla inkubována 20 hodin při 37°C a následně dlouhodobě uskladněna ve tmě při 4°C.

**Tab.č.1** – složení SOC média

Látka	Koncentrace
Trypton	20 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$
Kvasničný extrakt	5 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$
NaCl	10 mM
NaOH	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Glukóza	20 mM

### 5.2 Příprava minerálního média LM9A

Bylo připraveno celkem 450 ml minerálního média smísením 90 ml roztoku M9 (42mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 18mM NH<sub>4</sub>Cl, 8,6mM NaCl, sterilováno v autoklávu), 9 ml 20% (w/v) roztoku glukózy (k přípravě roztoku byla použita sterilní voda, roztok byl filtrován přes 13mm bakteriální filtr), 2,25 ml 5mM roztoku MgSO<sub>4</sub> (k přípravě roztoku byla použita sterilní voda, sterilováno v autoklávu), 4,5 ml 0,01% (w/v) thiaminu (k přípravě roztoku byla použita sterilní voda, roztok byl filtrován přes 13mm bakteriální filtr), 45 ml směsi aminokyselin (40  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  L-Ile, L-Val, L-Leu, 20  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  L-Lys, L-Phe, L-Thr, k přípravě roztoku byla

použita sterilní voda, roztok byl filtrován přes 13mm bakteriální filtr), 0,90 ml roztoku kovů (80,6mM EDTA, 2,15mM  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 92,5mM  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,56mM  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 13,5mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 10,6mM  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,62mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , pH 7,5, sterilováno v autoklávu), 0,45 ml zásobního roztoku ampicilinu (o koncentraci  $100 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ ) a doplněním do 450 ml sterilní vodou. Výsledné koncentrace látek v roztoku LM9A jsou uvedeny v Tab.č.2.

**Tab.č.2** – složení minerálního média LM9A

Látka	Molární koncentrace ( $\mu\text{M}$ )
Glukóza	$1,1 \cdot 10^6$
$\text{MgSO}_4$	40
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50
Thiamin	0,3
L-Lysin	684
L-Phenylalanin	605
L-Threonin	839
L-Isoleucin	381
L-Leucin	381
L-Valin	427
EDTA	161
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	27
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	21
$\text{H}_3\text{BO}_3$	3
Ampicilin	300

### 5.3 Exprese dACL240pM

Bakteriální kolonie po transformaci buněk *E. coli* B834 plasmidem s dACL240pM byla zaočkována do 35 ml LB média (složení LB media viz. Tab.č.3, str. 33) s ampicilinem o koncentraci 0,3 mM a inkubována přes noc na třepačce (Schoeller IKA KS 4000) při 37°C a 175 RPM.



**Tab.č.3** – složení LB média

Látka	Koncentrace
Trypton	10 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$
Kvasničný extrakt	5 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$
NaCl	86 mM
NaOH	1 mM

Noční kultura byla následně inokulována do tří 75ml a jedné 150 ml erlenmayerové baněk obsahujících 150 ml LB média s ampicilinem (koncentrace 0,3 mM) tak, aby výsledná OD<sub>600</sub> přibližně dosahovala hodnoty 0,05. Následovala inkubace na třepačce při 37 °C a 170 RPM do OD<sub>600</sub> 0,6 – 0,8.

Buňky byly poté schlazeny na ledu, sklizeny centrifugací (320R Hettich Centrifugen, 6místný úhlový rotor 1620a, 5000 RPM, 15 min, 4°C) a peleta třikrát promyta PBS puforem (složení PBS pufru viz. Tab č.4). Následovalo převedení, resuspenze pelet buněk v minerálním médiu LM9A a rovnoměrné rozdělení suspenze do čtyř erlenmayerových baněk. Tři baňky o objemu 250 ml obsahovaly 75 ml, třetí o objemu 500 ml obsahovala 150 ml minerálního média LM9A.

**Tab.č.4** – složení PBS pufru (pH = 7,4)

Látka	Koncentrace
NaCl	137 mM
KCl	3 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM

Po přidání pM (finální koncentrace 0,18 mM) a 20 min inkubaci při teplotě 30°C a 170 RPM, byl odebrán vzorek pro SDS-PAGE (čas t<sub>0</sub>) a přidáno IPTG do výsledné koncentrace 0,5mM. Tím byla zahájena exprese dACL240pM. V průběhu exprese byly odebrány vzorky pro SDS-PAGE po 3 a 7 hodinách. Po 7 hodinách byly buňky schlazeny na ledu, sklizeny centrifugací (centrifuga Universal 320R Hettich Centrifugen, 5000 RPM, 6místný úhlový rotor 1620a, 10 min, 4°C), peleta resuspendována ve 30 ml 20% (w/v) sacharózy a po 20 min inkubaci na ledu byly buňky opět centrifugovány (centrifuga Universal 320R Hettich

Centrifugen, 9000 RPM, 6místný úhlový rotor 1620a, 10 min, 4°C) a peleta uchována při -20°C.

## 5.4 Izolace dACL240pM

Všechny tři pelety sklizených buněk uskladněných při -20°C byly spojeny, resuspendovány ve 35 ml 0,5 mM roztoku  $MgCl_2$  obsahujícího rozpuštěnou tabletu inhibitoru proteáz (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics, 1 tableta rozpuštěna v 50 ml 0,5 mM roztoku  $MgCl_2$ ). Suspense byla inkubována 20 minut na ledu.

Následovala sonikace na ledu sonikační probou (sonikátor Bandelin Sonopuls, proba KE 76) a to celkem třikrát s 1 min relaxací, vždy po dobu jedné minuty s amplitudou pulsu 55 W (doba trvání pulsu 0,1s, klid, 0,1s). Po sonikaci byla směs (resp. resuspendované buňky) centrifugována (centrifuga Universal 320R Hettich Centrifugen, 9000 RPM, 10 min, 4°C, 6místný úhlový rotor 1620a). Vzniklý supernatant byl odebrán a peleta resuspendována ve 20 ml 0,5mM roztoku  $MgCl_2$  obsahujícího rozpuštěnou tabletu inhibitoru proteáz. Směs byla dále sonikována za stejných podmínek, opět centrifugována (centrifuga Universal 320R Hettich Centrifugen, 6místný úhlový rotor 1620a, 9000 RPM, 10 min, 4°C) a supernatant odebrán.

Následovala příprava kolony (S6651S – chitin sepharóza, průměr kolony 1,2 cm, délka 14cm) pro izolaci proteinu. Kolona byla napojena na pumpu (Gilson Minipuls Evolution, 7 RPM, průtok 0,78 ml/min) a promyta desetinásobkem svého objemu destilovanou vodou. Poté byla ekvilibrována 50 ml  $T_{50}Na_{150}E_1$  (složení viz. Tab.č.5 – str. 35). Dále byl na kolonu nanesen supernatant (celkem 35 ml) obsahující požadovaný protein a následně byla kolona promyta 25 ml  $T_{50}Na_{150}E_1$ . Na kolonu byl nanesen 100mM DTT (Dithiotreitol) v  $T_{50}Na_{150}E_1$  o objemu mrtvého objemu kolony a kolona v zastaveném toku byla inkubována přes noc při 4°C.

**Tab.č.5** – Složení T<sub>50</sub>Na<sub>150</sub>E

Látka	Koncentrace
Trizma base	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM

Po skončení inkubace byl na kolonu nanášen 100 mM roztok DTT v T<sub>50</sub>Na<sub>150</sub>E<sub>1</sub>, kterým proběhla eluce proteinu dACL240pM sbíraného do jednotlivých frakcí v časovém intervalu 2 min (Fraction Collector FRAC – 100 Pharmacia, objem frakce byl přibližně 1,5ml). Nosič po eluci proteinu byl regenerován promytím třemi objemy mrtvého objemu kolony 0,3M NaOH, pak inkubací 30 min v zastaveném toku a následně sedmi mrtvými objemy 0,3 M NaOH. Nosič byl nakonec promyt dvaceti mrtvými objemy vody a před uskladněním dvaceti pěti mrtvými objemy 20% (v/v) ethanolu <sup>29</sup>.

V alikvotu 5 µl z každé frakce byla provedena zkouška pro rychlé prokázání přítomnosti proteinu pomocí přidavku 50 µl Bradfordova činidla a následně z pozitivních frakcí připraveny vzorky pro SDS – PAGE a to následovně: z každé pozitivní frakce bylo odebráno 20 µl a smíseno s 5 µl 5x koncentrovaného redukčního vzorkového SDS – pufru. Vzniklá směs byla 5 minut vařena při 100°C (Inkubátor Ultimate Dry Bath Incubator) a poté centrifugována (stolní centrifuga Eppendorf F-45, 2 min, 14 000 RPM, laboratorní teplota). Tím byly připraveny vzorky, se kterými byla provedena SDS-PAGE v 12% gelu (20 mA, 200 V, Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150, Pharmacia). Gel byl následně barven roztokem barvy Coomassie Brilliant Blue R250 (90 ml destilované vody, 90 ml metanol, 20 ml kys. octová, 0,5g Coomassie Brilliant Blue) a odbarven odbarvovacím roztokem (90 ml destilované vody, 90 ml methanol, 20 ml kys. octová).

## 5.5 Finalizace preparátu dACL240pM

Pomocí Bradfordovy zkoušky a SDS-PAGE jsme určili frakce s nejvyšší koncentrací dAC. Tyto frakce jsme spojili a následně koncentrovali pomocí centrifugačního koncentrantrátoru

(Amicon Ultra s membránou „cut off“ 10 kDa) a centrifugy (centrifuga Universal 320R Hettich Centrifugen, 6místný úhlový rotor 1620a, 3000 RPM, 10 min, 4°C). Získaný finální preparát byl dále dialyzován v 1 l dialyzačního pufru T<sub>50</sub>Na<sub>150</sub> (pH = 7,4) 2 hodiny, následně byl dialyzační pufr vyměněn a vzorek byl dialyzován proti 1 l stejného dialyzačního pufru přes noc. Získaný dialyzovaný vzorek proteinu dACL240pM byl uchován při -80°C.

## 5.6 Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA)

Stanovení koncentrace proteinu ve finálním preparátu dACL240pM bylo provedeno na mikrotitrační destičce. Do každé jamky bylo vždy pipetováno 5 µl příslušné složky: destilovaná voda, která sloužila jako slepý vzorek, standardy BSA o koncentracích 0,1  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ , 0,2  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ , 0,5  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  a 1  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ . Následně jsme připravili dva měřené vzorky dACL240pM – jednalo se o 5 µl 10x zředěného a 5 µl 50x zředěného finálního proteinového preparátu. Každou složku jsme pipetovali v triplikátech. U všech pipetovaných složek jsme změřili absorbanci při 562 nm po 60 min inkubaci při 37°C. Ze změřených údajů jsme vytvořili kalibrační přímku, pomocí níž jsme vypočítali hmotnostní koncentraci proteinu ve finálním preparátu dACL240pM.

## 5.7 Příprava vzorku proteinového proužku gelu z SDS – PAGE pro MS

Po odbarvení gelu v odbarvovacím roztoku byly z gelu skalpelem vyříznuty analyzované proteinové proužky, nakrájeny skalpelem na drobné kostky a vpraveny do zkumavky obsahující směs o celkovém objemu 120 µl o složení 50% (v/v) ACN v 50mM EtMf pH 8,0. Obsah této zkumavky byl 5 až 10 minut sonikován v sonikační lázni a supernatant byl odebrán. Tento krok byl opakován do úplného odbarvení kousků gelu. Pak jsme přidali 100 µl ACN a následovala sonikace 1 minutu a odebrání supernatantu. Poté jsme přidali 100 µl sterilní vody, sonikovali 1 minutu, odebrali supernatant, opět přidali 100 µl ACN, sonikovali 1 minutu a odebrali supernatant. Poté jsme do zkumavky vpravili 100 µl sterilní vody a 100 µl ACN, sonikovali 5 minut, odstranili supernatant a následně gel sušili 10 minut ve vakuovém rotačním inkubátoru (LabConco CentriVap micro IR, 10 min, 37°C). Na závěr jsme ke gelu

přidali 20  $\mu$ l štěpícího pufru (50mM EtMf pH8,1, 10%(v/v) ACN) a 1  $\mu$ l zásobního roztoku endoproteázy Arg-C (z bakterie *Clostridium histolyticum* o koncentraci  $0,1 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ ). Směs jsme inkubovali přes noc při 37°C.

## 5.8 MALDI-TOF dACL240pM

Byla připravena směs ACN s 0,5% (v/v) roztokem trifluoroctové kyseliny (dále TFA) a přidána ke vzorkům v gelu po proteolýze, tak aby finální koncentrace ACN byla 30% (v/v) a TFA 0,1% (v/v). Dále byla připravena matrice, a to smísením jednoho dílu ACN, jednoho dílu destilované vody a jednoho dílu metanolového roztoku alfa-kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny (koncentrace 53mM). Na měřicí destičku bylo nanášeno 0,7 až 1  $\mu$ l vzorku po 20 min sonikaci v sonikační lázni, a po odpaření byla pozice převrstvena roztokem matrice. Po vzniku krystalků byla celá měřicí destička umístěna do hmotnostního spektrometru. Na základě tohoto měření MALDI-TOF jsme určili míru inkorporace pM do primární struktury dAC jako podíl intenzity signálu  $m/z$  peptidů s inkorporovaným pM a součtu intenzit signálu  $m/z$  peptidů s inkorporovaným pM a  $m/z$  peptidu s Methioninem v sekvenci.

## 5.9 Fotolýza

Zásobní roztoky dACWtpM (přirozená forma proteinu dAC s Leucinem v pozicích 240 a 241), dACL240pM (dAC, která na pozici 240 obsahuje místo leucinu M/pM) a dACL241pM (dAC, která na pozici 241 obsahuje místo leucinu M/pM), uchovávané při teplotě -80°C, byly inkubovány při 4°C dokud preparát proteinu neroztál. Následně byl vytvořen roztok směsi 40mM ATP, 80mM  $\text{MgCl}_2$  a 80 $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$  (dále Mix). Z něj a z roztoků  $\text{T}_{50}$ ,  $\text{T}_{50}\text{Na}_{150}$ , 5mM EDTA a CaM (koncentrace přibližně 10 $\mu$ M) jsme dále vytvořili vzorky pro fotolýzu podle Tab. č.6 nebo Tab.č.7. Některé ze vzniklých vzorků byly následně fotolýzovány po dobu 1 minuty pomocí xenonové UV lampy Oriel Instruments 60100 (chlazena vodou za použití pumpy Peristaltic pump S32, Labimex service), (dle popisu v Tab.č.6 a 7 – str. 38). Ze všech připravených vzorků byla provedena SDS-PAGE v 12% gelu po přidavku 5  $\mu$ l 5x koncentrovaného vzorkového redukčního SDS-pufru.

**Tab.č.6** – Tabulka objemů roztoků Mix, T<sub>50</sub>, T<sub>50</sub>Na<sub>150</sub>, 5mM EDTA a CaM (μl) pro SDS-PAGE v 12% gelu. Fotolýzované vzorky jsou označeny ve sloupci „fotolýza“ znaménkem +.

vzorek	T <sub>50</sub>	T <sub>50</sub> Na <sub>150</sub>	5mM EDTA	Mix ATP, Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	CaM	dAC	dH <sub>2</sub> O	Fotolýza	Protein dAC
1	10	-	-	1,5	3	5	0	+	WT
2	10	-	-	1,5	3	5	0	-	WT
3	10	-	-	1,5	3	2	3	+	L240pM
4	10	-	-	1,5	3	2	3	-	L240pM

Následně byla připravena druhá sada vzorků pro SDS-PAGE podle Tab.č.7. Ta byla rovněž provedena v 12% gelu.

**Tab.č.7** – Tabulka objemů roztoků Mix, T<sub>50</sub>, T<sub>50</sub>Na<sub>150</sub>, 5mM EDTA a CaM (μl) pro SDS-PAGE v 12% gelu. Fotolýzované vzorky jsou označeny ve sloupci „fotolýza“ znaménkem +.

vzorek	T <sub>50</sub>	T <sub>50</sub> Na <sub>150</sub>	5mM EDTA	Mix ATP, Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	CaM	dAC	dH <sub>2</sub> O	Fotolýza	Protein dAC
11	10	-	-	1,5	6	2	0	-	L240pM
12	10	-	-	1,5	3	2	3	+	L240pM
13	10	-	-	1,5	6	2	0	+	L240pM
14	-	10	-	1,5	6	2	0	+	L240pM
15	10	-	1,5	-	6	2	0	+	L240pM
16	10	-	-	1,5	0	2	6	+	L240pM
17	10	-	1,5	-	0	2	6	+	L240pM
18	10	-	-	1,5	3	5	0	+	L241pM
19	0	-	1,5	-	3	5	0	+	WT

## 5.10 Příprava fotolyzovaných vzorků z SDS-PAGE pro MS

Příprava fotolyzovaných proteinů pro MS proběhla analogicky jako předchozí příprava proteinů pro měření inkorporace pomocí MS (viz. oddíl 5.7). Rozdílná byla pouze použitá proteáza. V tomto případě jsme po sušení ve vakuovém rotačním inkubátoru (LabConco CentriVap micro IR, 10 min, 37°C) přidali 20  $\mu$ l štěpícího pufru (50mM EtMf pH8,1, 10%(v/v) ACN) a 0,67  $\mu$ l roztoku Sequencing Grade Trypsinu (o koncentraci  $0,1 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ ). Směs jsme inkubovali přes noc při 37°C.

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Produkce a purifikace proteinu dACL240pM

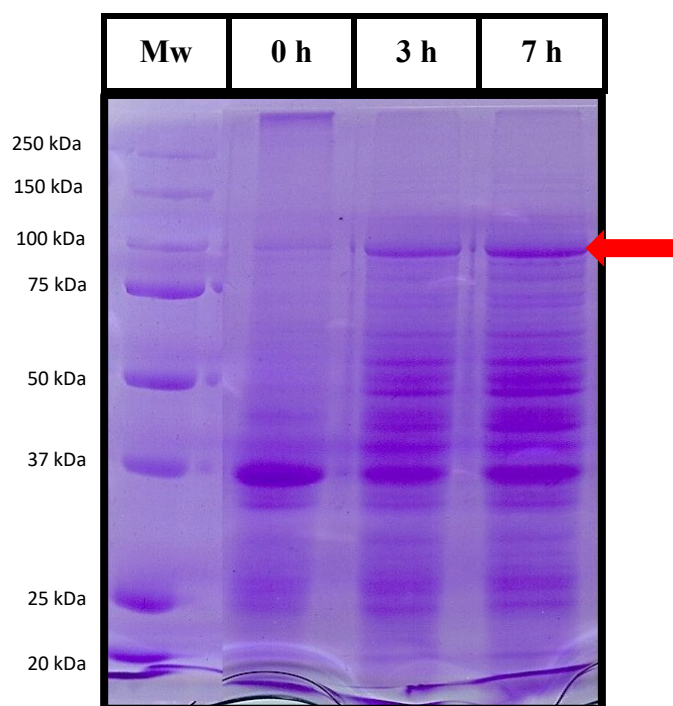
Alikvot 50  $\mu\text{l}$  *E. coli* B834 byl transformován 80 ng plasmidu. Na agarosové plotně s ampicilinem (koncentrace 100  $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ ) vyrostlo několik kolonií. Jedna z kolonií byla použita k inokulaci 35 ml LB media s ampicilinem pro přípravu noční kultury a následnou expresi konstruktu dACL240pM-CBD (konstrukt N-terminální domény aminokyselin 1 – 385 dAC s chitin vázající doménou). Následující den byla měřena OD<sub>600</sub> noční kultury a při ředění 1:1 vykazovala hodnotu 0,8376 (viz. Tab.č.8). Do 75 ml LB media v 250ml erlenmayrově baňce bylo přidáno 2,5 ml noční kultury a do 150 ml LB media v 500ml erlenmayrově baňce bylo inokulováno 5 ml noční kultury. Následující růst byl monitorován měřením OD<sub>600</sub> (hodnoty uvedeny v Tab.č.8). Při dosažení hodnoty 0,7 po 7 h inkubaci byly buňky sklizeny, promyty PBS a resuspendovány v minerálním mediu s přidavkem pM. Před přidavkem IPTG byl odebrán vzorek pro SDS – PAGE (čas  $t = 0$  h, viz. Obr.č.12 – str.41).

**Tab.č.8** – hodnoty OD<sub>600</sub> noční kultury a růstové kultury 1,3 a 7 hodin po přidavku IPTG

Měřený vzorek	OD <sub>600</sub>
Noční kultura (ředění 1:1)	0,8376
Růstová kultura po 1 h	0,1876
Růstová kultura po 3 h	0,3462
Růstová kultura po 7 h	0,7326

Dále byly odebírány vzorky růstové kultury po 1,3 a 7 hodinách od přidavku IPTG, se kterými jsme provedli SDS-PAGE v 10% gelu (Obr.č.12 – str.41), kterou jsme monitorovali vzrůstající produkci rekombinantního proteinu dACL240pM-CBD jejíž relativní mobilita v SDS-PAGE odpovídala proteinovému proužku označenému červenou šipkou v dráze 7h na Obr.č.12 - str. 41 ( $M_w$  konstrukt odpovídá 99 kDa). Expres proteinu dopadla úspěšně, po sklizení buněk na ledu jsme získali peletu obsahující exprimovaný protein dACL240pM-CBD.





**Obr.č.12** – *SDS-PAGE* růstové kultury po 0,3 a 7 hodinách od přidavku IPTG v 10% gelu. Červená šipka označuje polohu dACL240pM-CBD. Z rostoucí intenzity proteinových proužků je vidět, že koncentrace tohoto proteinu v průběhu času roste.

S touto peletou jsme dále zacházeli podle postupu popsáném v oddílu 5.4. Po 20minutové inkubaci suspenze buněk na ledu v 0,5mM roztoku  $\text{MgCl}_2$ , obsahujícím rozpuštěnou tabletu inhibitoru proteas, následovala sonikace 1. Celková energie použitých sonikačních pulsů je uvedena v Tab.č.9.

**Tab.č.9** – Energie pulsů při sonikacích resuspendované pelety transformovaných buněk s exprimovaným dACL240pM-CBD

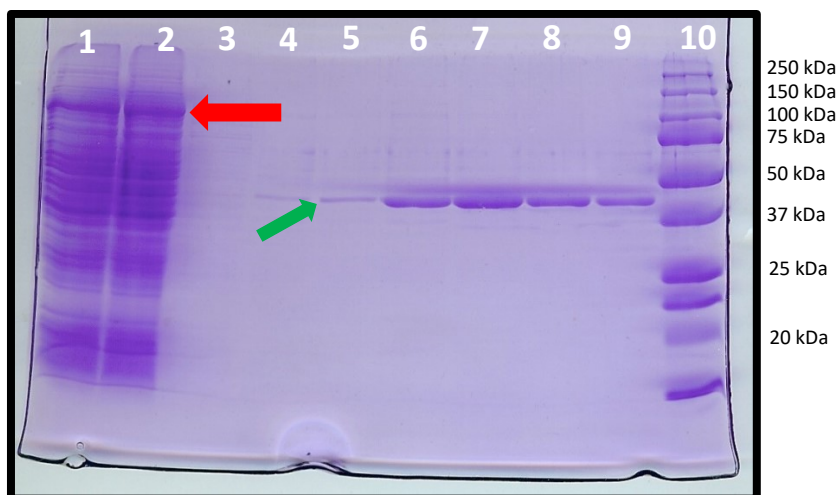
Sonikace 1	Energie pulsu (kJ/min)	Sonikace 2	Energie pulsu (kJ/min)
1.	1,628	1.	6,480
2.	3,256	2.	8,041
3.	4,880	3.	9,568

Po sonikaci proběhla centrifugace (centrifuga Universal 320R Hettich Centrifugen, 9000 RPM, 10 min, 4°C, 6místný úhlový rotor 1620a). Supernatant jsme odebrali a uschovali

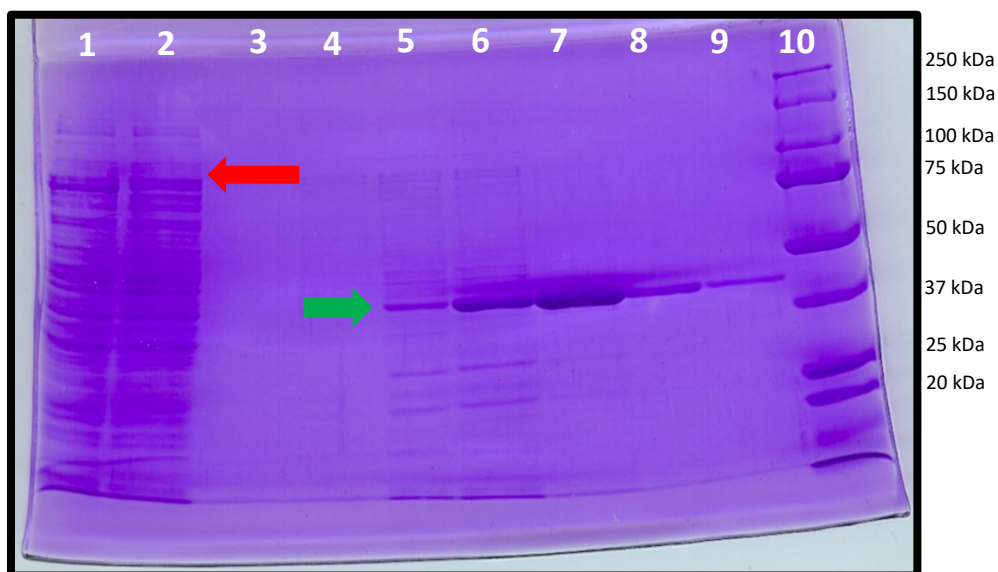
při 4°C. Protože byla získána větší peleta, byla opět provedena resuspenze ve 20 ml 0,5mM roztoku MgCl<sub>2</sub> a sonikace za stejných podmínek (energie pulsů při této sonikaci je uvedena v Tab.č.9, Sonikace 2 – str.41). Po centrifugaci jsme peletu odstranili a oba supernatanty spojili a uskladnili při 4°C.

Na ekvilibrovanou kolonu jsme nanесли spojené supernatanty rychlostí  $0,78 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$ . Po promytí ekvilibračním pufrém (25 ml) jsme na kolonu s nosičem chitin sepharosa nanесли 4 ml (mrtvý objem) 100mM roztok DTT v pufru a inkubovali při 4°C. V tomto kroku by mělo působením DTT dojít k odštěpení dAC domény od CBD domény, která zůstává ve vazbě s chromatografickým nosičem. Protein jsme následně eluovali při průtokové rychlosti  $0,78 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$  (nastavení peristaltické pumpy 7 RPM) a sbírali jsme jednotlivé frakce. Z nich jsme odebrali vzorky, provedli Bradfordovu zkoušku na přítomnost proteinu a z posbíraných frakcí s pozitivní reakcí na přítomnost proteinu (3 - 9) jsme provedli SDS – PAGE.

Se vzorky z nanášeného supernatantu, frakce nezachycených proteinů a sebraných frakcí 3, 4, 5, 7, 8 a 9 byla provedena elektroforéza v 10% SDS – PAGE (viz. Obr.č.13 – str. 43, frakce 6 nebyla na gel nanášena, dostatečný výskyt proteinu v ní byl doložen Bradfordovou zkouškou). Na základě této elektroforézy se ukázalo, že poměrně značné množství proteinu se na koloně nezachytilo a bylo přítomné ve frakci nezachycených proteinů („flow through“), jak je vidět z gelu na Obr.č.13, dráha 2 - str.43, proteinový proužek označený červenou šipkou. Chitinová náplň kolony nebyla schopna dostatečně vázat veškerý nanesený proteinový konstrukt dAC-CBD. To mohlo být způsobeno překročením kapacity nosiče, opotřebením náplně kolony a snížení jeho kapacity opakovaným používáním<sup>29</sup>, nebo nevhodně zvolenou rychlostí průtoku při nanášení supernatantu. Proto jsme celý postup chromatografie zopakovali po regeneraci nosiče v koloně. Tentokrát jsme místo supernatantu nanášeli na kolonu „flow through“ z předchozí chromatografie. Snížili jsme také rychlost průtoku peristaltické pumpy na  $0,45 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$  (nastavení peristaltické pumpy na 4RPM), aby protein kolonou protékal déle a zvýšila se míra jeho vazby na nosič.



**Obr. č. 13** - V dráze 1 je nanášený supernatant, v dráze 2 frakce nezachycených proteinů „flow through“, dráha 3 je promytí. V následujících drahách jsou získané frakce eluce proteinu (frakce 3 až 9). V desáté dráze je standard  $M_w$ . Zelená šipka ukazuje polohu proteinu dACL240pM, který eluoval během první chromatografie. Červená šipka označuje výskyt proteinu dACL240pM-CBD jak v supernatantu, tak ve „flow through“.



**Obr. č. 14** – V dráze 1 je nanášené „flow through“ z minulé chromatografie, v dráze 2 je „flow through“ z druhé chromatografie. Červená šipka označuje oblast výskytu proteinu v nanášeném vzorku („flow through“ z minulé chromatografie, dráha 1) a nově získaném „flow through“ (dráha 2). Můžeme zde vidět, že koncentrace proteinu se v nově získaném „flow through“ snížila. Protein tedy eluoval ve větší míře. To je vidět i na oblasti drah sebraných frakcí z druhé izolace (dráhy 4 až 9, oblast označená zelenou šipkou), kde proteinové proužky proteinu dACL240pM dosahují větší intenzity než při minulé elektroforéze. Dráha 3 je promytí, dráha 10 je standard molekulových hmotností.

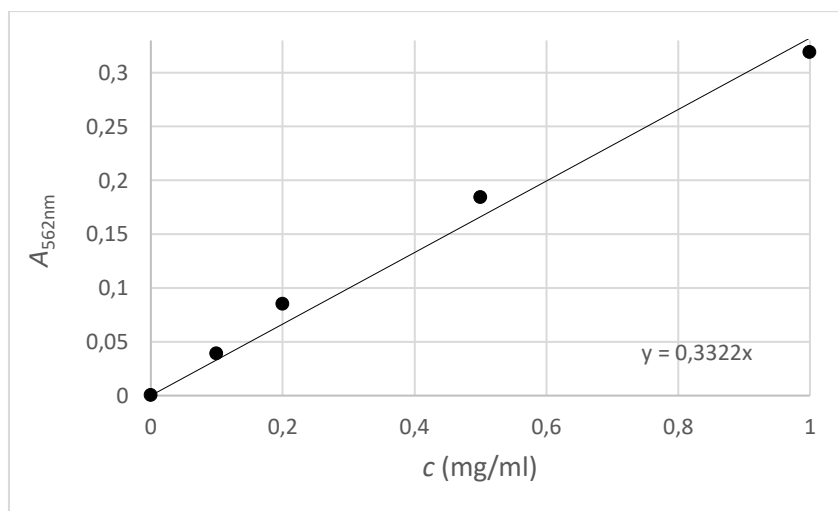
Jak je vidět z Obr.č.14, došlo opakovanou chromatografií ke snížení množství nenavázaného proteinu dACL240pM-CBD na nosič kolony. Z nosiče byl úspěšně eluován 100mM roztokem DTT protein dACL240pM v obou případech chromatografie, což ukazuje Obr.č.13, dráhy 5-9 i Obr.č.14 (str.43), dráhy 5-9 (zelená šipka označuje proteinový proužek odpovídající relativní mobilitou dACL240pM proteinu s  $M_w$  41 kDa).

Pomocí Bradfordovy zkoušky a SDS-PAGE jsme určili frakce s nejvyšší koncentrací proteinu dACL240pM (jednalo se o frakce 4 až 9 z první chromatografie a frakce 5 až 10 z druhé

opakované chromatografie). Všechny tyto frakce jsme spojili, zahustili pomocí centrifugačního koncentrátoru a dialyzovali. Ve finálním objemu 300  $\mu\text{l}$  proteinového preparátu dACL240pM byla UV-VIS spektrofotometricky stanovena hodnota maxima absorpce při vlnové délce 280 nm ( $A_{280} \sim 2,2$ ).

## 6.2 Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA)

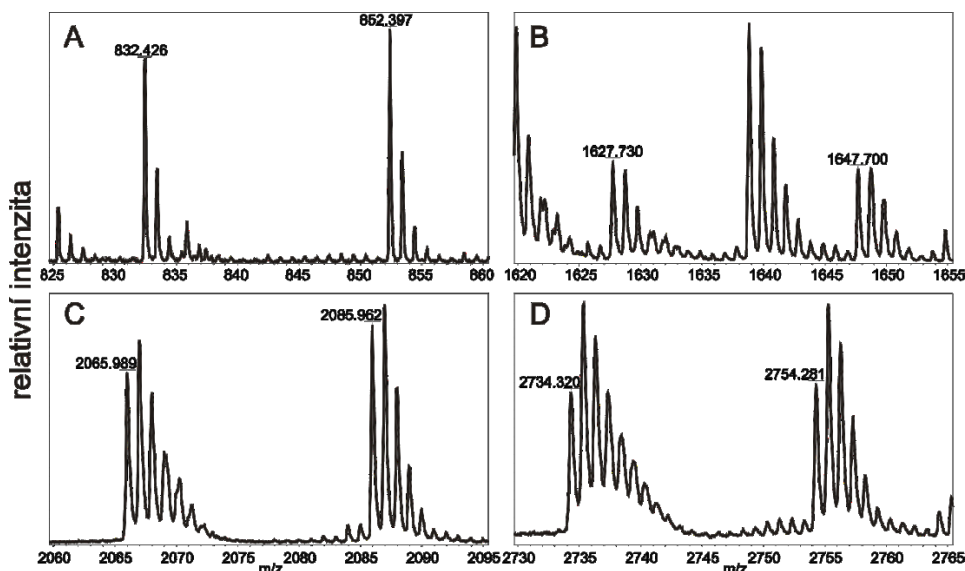
Na základě změřené absorpce při 562 nm (spektrometr Multiscan GO, Thermo Scientific) jednotlivých kalibračních vzorků BSA o koncentracích  $0,1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ ,  $0,2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ ,  $0,5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ ,  $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  a deionizované vody (slepý vzorek) jsme vytvořili kalibrační křivku (viz. Obr.č.15). Podle ní jsme určili koncentraci v 10x zředěném (průměrná hodnota  $A_{562\text{nm}}$  byla 0,089) a 50x zředěném (průměrná hodnota  $A_{562\text{nm}}$  byla 0,020) preparátu dACL240pM. Hmotnostní koncentraci proteinu z hodnoty  $A_{562\text{nm}}$  z 10x zředěného finálního preparátu jsme stanovili na hodnotu  $2,45 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ . Pro výpočet hmotnostní koncentrace proteinu jsme nepoužili hodnotu z 50x zředěného finálního preparátu, protože její hodnota  $A_{562\text{nm}}$  byla nižší než hodnota nejnižšího použitého standardu koncentrace proteinu ( $0,1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ ).



**Obr.č.15** – Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny

## 6.3 Charakterizace míry inkorporace pM pomocí MALDI – TOF MS

Připravili jsme vzorky podle postupu popsaného v oddíle 5.7 a analyzovali je pomocí MALDI-TOF MS. Vybrané úseky hodnot  $m/z$  MS spektra jsou zobrazeny na Obr.č.16.



**Obr.č.16** – Změřená spektra vybraných peptidů pomocí MS. Vybrané peptidy jsou označené A, B, C a D.

Signály peptidu A (sekvence dACL240pM mezi aminokyselinami 35 – 41) obsahujícího pM, mají hodnotu  $m/z$  832,426, jestliže obsahuje M, mají hodnotu  $m/z$  852,397. Signály peptidu B (sekvence dACL240pM mezi aminokyselinami 313 - 327) obsahujícího pM, mají hodnotu  $m/z$  1627,73, pokud obsahuje M, mají hodnotu  $m/z$  1647,7. Signály peptidu C (sekvence dACL240pM mezi aminokyselinami 263 – 280) obsahujícího pM, mají hodnotu  $m/z$  2065,989, jestliže obsahuje M, mají hodnotu  $m/z$  2085,962. Signály peptidu D (sekvence dACL240pM mezi aminokyselinami 125 – 150) obsahujícího pM, mají hodnotu  $m/z$  2734,32, jestliže obsahuje M, mají hodnotu  $m/z$  2754,281 (viz.Tab.č.10 – str. 46)

Ze získaných ploch pro vrcholy  $m/z$  signálu vybraných čtyř peptidů s pM a M jsme stanovili míru inkorporace ( $P_i$ ) do primární sekvence dACL240pM podle rovnice:

$$P_i = \frac{A_{pM}}{A_{pM} + A_M} \quad (2)$$

$P_i$  – Míra inkorporace pM do primární struktury peptidu A až D,  $A_{pM}$  – relativní plocha vrcholu signálu vybraného peptidu s pM,  $A_M$  - relativní plocha vrcholu signálu vybraného peptidu s M.

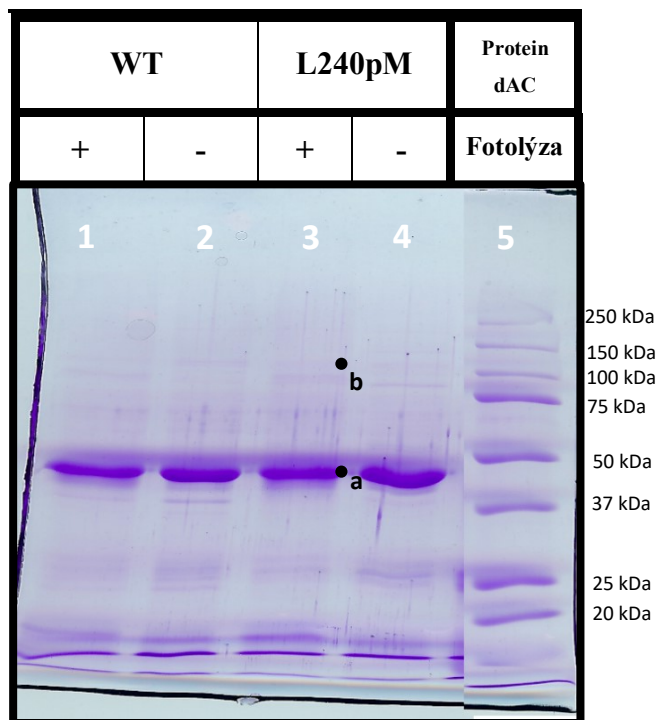
**Tab.č.10** – Aminokyselinové sekvence peptidů A,B,C a D, hodnoty změřených signálů  $m/z$ , plochy signálů  $m/z$  a procentuální inkorporace pM ( $P_i$ )

peptid	sekvence [od-do]	signál $m/z$	plocha signálu $m/z$	inkorporace pM ( $P_i$ ) (%)
A	35-41pM	832.426	4987	48
	35-41M	852.397	5432	
B	313-327pM	1627.73	10708	54
	313-327M	1647.7	8971	
C	263-280pM	2065.989	15544	47
	263-280pM	2085.962	17209	
D	125-150pM	2734.32	16445	52
	125-150M	2754.281	15124	

Hodnoty míry inkorporace pM do sekvence všech čtyř analyzovaných peptidů se pohybují v rozsahu 47 – 54 % a proto míra inkorporace pM do primární struktury proteinu byla stanovena přibližně na 50 %.

## 6.4 Fotolýza

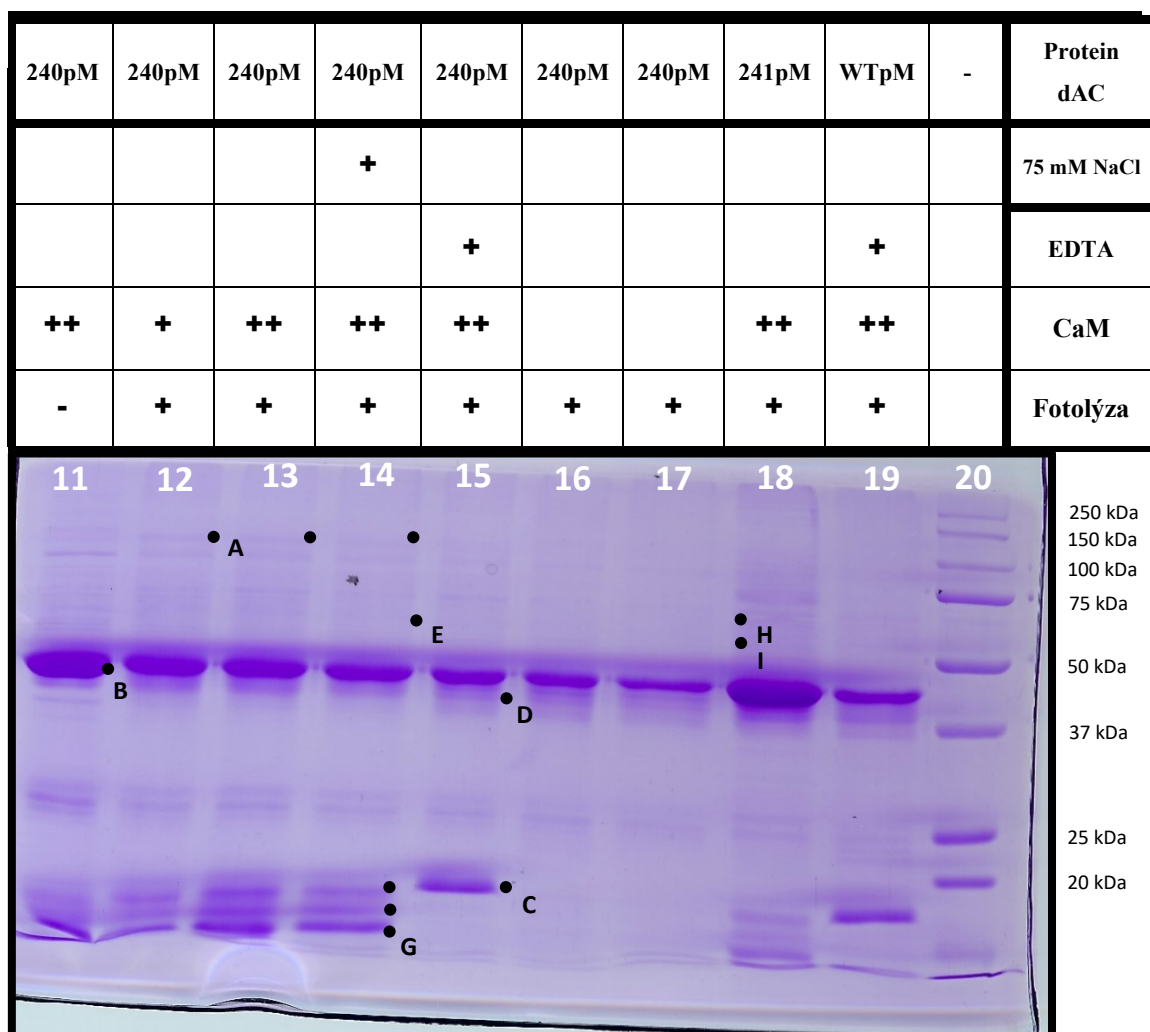
Podle postupu v oddílu 5.9 jsme připravili vzorky proteinů a provedli celkem dvě fotolýzy proteinů za různých podmínek (viz. Tab.č.6 a 7, str. 38). Na Obr.č.17 (str. 47) je vidět gel získaný po první fotolýze a charakterizaci produktů SDS-PAGE po síťovacím experimentu proteinu dACL240pM nebo dACWTpM s CaM v přítomnosti vápenatých a hořečnatých iontů a ATP.



**Obr.č.17** – SDS – PAGE první fotolýzy. Pozice v gelu je označena černou tečkou a malým písmenem psaným kurzívou, vždy napravo od příslušného proteinového proužku.

Bod *a* označuje oblast výskytu monomerních dACL240pM a dACWTpM. Bod *b* popisuje oblast, u které došlo k tvorbě nového proteinového proužku po fotolýze dACL240pM s CaM (dráha 3), ve srovnání s dráhou, ve které jsou přítomné oba proteiny bez fotolýzy (dráha 4). Podobné chování nebylo pozorováno u proteinu dACWTpM (dráhy 1 a 2), který má v aminokyselinové sekvenci Leucin v pozici 240.

Na Obr. č.18 je gel z SDS-PAGE charakterizující produkty z druhé fotolýzy.



**Obr.č.18** – SDS – PAGE druhé fotolýzy. Dráhy jsou označeny podle pořadí vzorků, v dráze č.10 je standard molekulových hmotností. Pozice v gelu je označena černou tečkou a velkým písmenem vždy napravo od příslušného proteinového proužku. Přídavek dané látky (NaCl, EDTA nebo CaM) do fotolyzované směsi je v tabulce nad gelem označen symbolem +. Dva symboly + odpovídají 6μl CaM, jeden symbol + odpovídá 3 μl CaM. Pokud byl vzorek fotolyzován, je označen stejným symbolem.

Bod B označuje pozici různých mutantních verzí dAC. Bod A popisuje oblast, ve které se nachází intermolekulárně zesítněné molekuly. Tyto proteinové proužky se nachází v oblasti s více než dvojnásobnou relativní pohyblivostí oproti monomeru dAC. Z této oblasti jsme rovněž získali signály  $m/z$  pro peptidy CaM, relativní pohyblivostí však tato oblast neodpovídá heterodimeru dAC-CaM ( $M_w$  přibližně 57kDa). Je možné, že se zde vyskytuje heterotetramer složený ze dvou molekul dAC a dvou molekul CaM. Oblast v okolí bodu D jsou intramolekulárně zesítněné proteiny. V bodě C je CaM v neaktivní podobě (EDTA zde

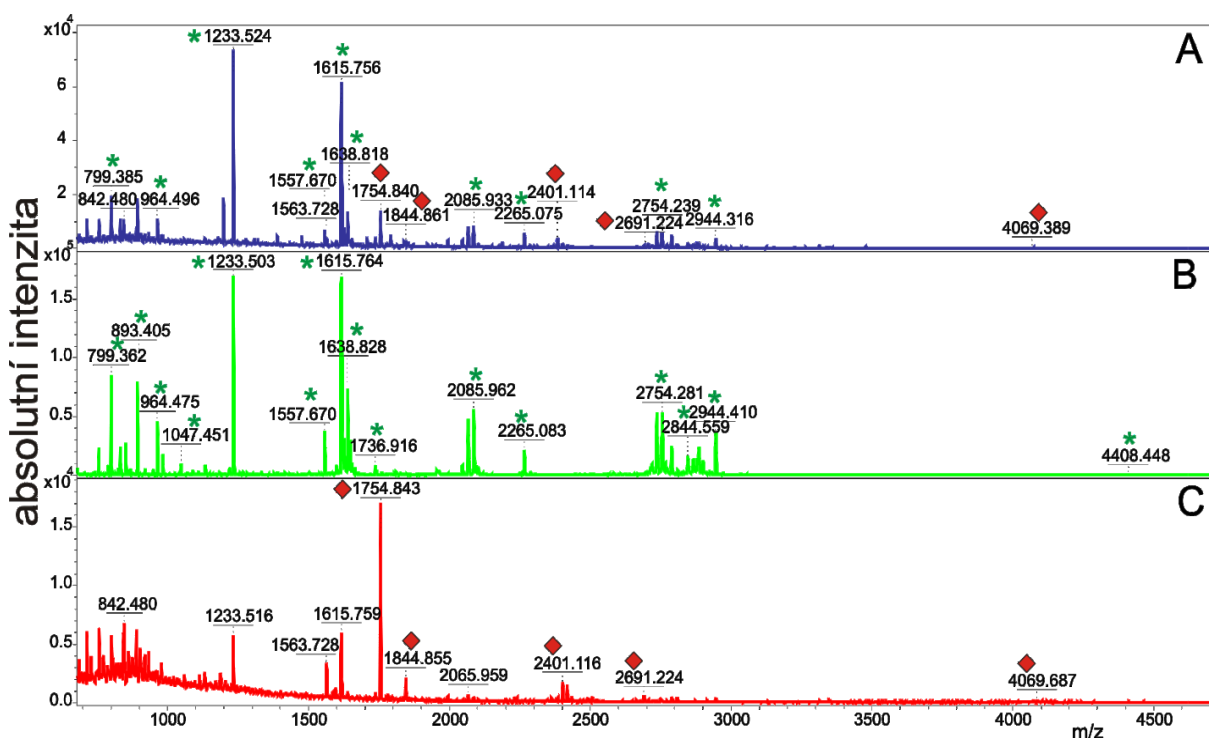


váze volné  $\text{Ca}^{2+}$ ). Proteinový proužek označený G obsahuje C-terminální fragment dAC. Pomocí MS jsme zkoumali i body E, H a I, ve kterých jsme předpokládali, že dojde k zesílení dACL240pM nebo dACL241pM s CaM. Signály  $m/z$  ze které by toto zesílení dokládali, jsme ale nezískali v MALDI-TOF spektru.

V dráhách 12 až 14 byl výsledek fotolýzy přibližně stejný, přítomnost  $\text{T}_{50}\text{Na}_{150}$  nebo snížená koncentrace CaM neměla na výsledek tvorby pozorovaného heterodimeru velký vliv.

## 6.5 MS analýza

Připravili a změřili jsme MS vzorky proteinových proužků A - H z druhé fotolýzy podle postupu v oddílech 5.10 a 5.8. Tři vybraná hmotnostní spektra proužků A, B a C jsou zobrazena na Obr.č.19.



**Obr.č.19** – Hmotnostní spektra vzorků A, B a C. Signály pro charakteristické peptidy primární sekvence dACL240pM jsou označeny symbolem \*, Signály pro charakteristické peptidy primární sekvence CaM jsou označeny symbolem ♦.

Ve spektru vzorku C náleží nejsilnější signály peptidům CaM, což koresponduje s pozicí analyzovaného proteinového proužku na SDS – PAGE gelu (viz. Obr. č. 18, dráha 15, str. 48). Další signály patří dAC, případně nejsme signály schopni identifikovat a přiřadit konkrétním proteinům. Ve spektru vzorku B, se nacházejí charakteristické signály pro peptidy dACL240pM. Peptidy obou proteinů jsme identifikovali jednak manuálně srovnáním

získaných hodnot  $m/z$  signálů s teoreticky generovanými hodnotami  $m/z$  teoretických peptidů obou proteinů po štěpení trypsinem, pomocí programu GPMW (Light House Data), nebo analýzou získaných signálů  $m/z$  pomocí MASCOT serveru (Matrix Science, [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) s nastavením analýzy peptide mass fingerprint: enzym – trypsin, mass value – monoisotopic, peptide mass tolerance – 45 ppm, database – NCBI prot 20191120, taxonomy – *Bacteria*. Ve vzorku C byl signifikantně identifikován CaM – izoforma 2 s Mascot score 88 (signifikanční výsledek se skóre >66,  $p < 0,05$ ), s pokrytím sekvence zobrazeným na Obr.č.20.

Ve spektru vzorku B se exkluzivně nacházejí signály  $m/z$  peptidů dACL240pM. Výsledek prohledávání pomocí webového programu Mascot server vedl k identifikaci domény dAC s hodnotou skóre 200 (signifikanční identifikace pro skóre větší než 95,  $p < 0,05$ ) a pokrytím sekvence identifikovaných peptidů na Obr.č.21.

1 MADQLTEEQI AEFKEAFSLF DKDGDGTITT KELGTVMRSL GQNPTEAELQ  
51 DMINEVDADG NGTIDFPEFL TMMARKMKDT DSEEEIREAF RVFDKDGNGY  
101 ISAAELRHVM TNLGEKLTDE EVDEMIREAD IDGDGQVNYE EFVQMMTAK

**Obr.č.20** – Pokrytí primární sekvence získané MS analýzou peptidů po trypsinizaci proteinu ze vzorku C. Červeně jsou vyznačeny úseky, které byly pozitivně určeny.

1 MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVNPHSTSL  
51 IAEGVATKGL GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV  
101 NSSLAHGHTA VDLTSLKERL DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR  
151 VKETSDGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIGNA AGIPLTADID MFAIMPHLSN  
201 FRDSARSSVT SGDSVTDYLA RTRRAASEAT GGLDRERIDL LWKIARAGAR

**Obr.č.21** – Pokrytí primární sekvence získané MS analýzou peptidů po trypsinizaci proteinu ze vzorku A. Červeně jsou vyznačeny úseky, které byly pozitivně určeny.

Ve spektru vzorku A na Obr.č.19 se nachází signály peptidů obou proteinů dACL240pM i CaM, což je velice překvapivé z pohledu obdržené mobility proteinového proužku (odpovídá přibližně proteinu o  $M_w$  100 kDa), protože heterodimer obou proteinů by měl mít hodnotu  $M_w$  57 kDa (41 + 16 kDa). Na základě MS výsledků můžeme tvrdit, že mezi těmito proteiny došlo pravděpodobně k fotochemickému zesílení. Není ale zcela jasné, jak konkrétní proteiny mezi sebou byly zesíleny. Teoreticky se může jednat o vznik dimerů dACL240pM, nicméně identifikovali jsme v proteinovém proužku A (Obr.č.18, dráhy 12 – 14 - str. 48) i signály

odpovídající přítomnosti peptidů CaM. To však neodpovídá mobilitě proteinu v gelu, pozice vzorku A byla nad hranicí 100 kDa. Mobilita dvou molekul dAC by se měla pohybovat v okolí 82 kDa. Z mobility lze usuzovat o vytvoření heterotetrameru dvou molekul dAC se dvěma molekulami CaM (přibližně  $82 + 32 = 114$  kDa), nebo heterotrimeru dvou molekul dAC a jedné molekuly CaM (přibližně  $82 + 16 = 96$  kDa). Bohužel ale nevíme, jakým mechanismem k zesítnění došlo. Další informace o zesítnění proteinů ve vzorku B by mohla poskytnout tandemová MS/MS. Tu jsme bohužel nemohli provést z důvodu poruchy LIFT modulu použitého hmotnostního spektrometru MALDI-TOF.

## 7 Diskuze

### 7.1 Úvod

Bakterie *B. pertussis* způsobuje v lidské populaci nemoc zvanou černý kašel, která se v posledních desetiletích opět rozšiřuje.<sup>4</sup> Jedním z virulentních faktorů *B. pertussis* je ACT. Tento protein napadá hostitelské buňky dýchací soustavy, do nich translokuje svou katalytickou membránu a syntetizuje cAMP, jehož nadměrná produkce způsobí apoptózu hostitelské buňky. Katalytická doména (adenylátcyklázová doména – dAC) má sama o sobě pouze malou enzymatickou aktivitu, ke své optimální funkci vyžaduje nekovalentní interakci s eukaryotním CaM. Ten je schopen interakce s dAC pouze ve své aktivní formě (pokud jsou na něj nekovalentně navázány ionty vápníku)<sup>14</sup>.

Předmětem této práce bylo studium nekovalentní interakce dAC s CaM se zaměřením na participaci aminokyselin v blízkosti pro interakci nezbytného tryptofanu 242<sup>27</sup>. Do primární struktury dvou mutantních dAC se záměnou Leucinů na pozice 240 a 241 za Methionin byl rekombinantní expresí v minerálním mediu částečně inkorporován pM, který sloužil jako síťovací činidlo pro fotochemické zesíťení. Po fotochemickém zesíťení jsme kovalentně propojené proteiny studovali pomocí SDS-PAGE a po proteolýze identifikovaných proteinových proužků charakterizovali MS.

### 7.2 Exprese a izolace

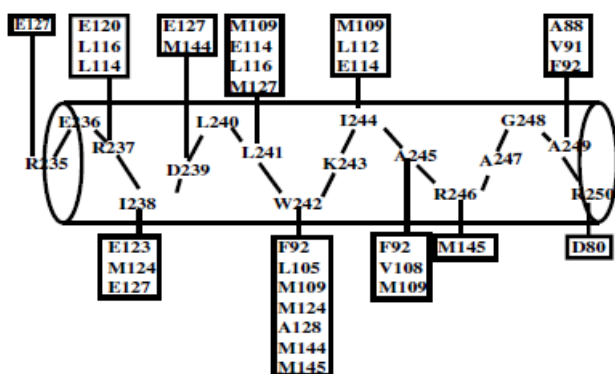
Exprese proteinu za použitých podmínek vedla k dostatečné produkci proteinu s přibližně 50% inkorporací pM. Při první izolaci dACL240pM nedošlo k dostatečnému zachycení proteinu na koloně. Dokládají to proteinové proužky po proběhlé SDS-PAGE ve 12% gelu. Dráhy s nanášeným supernatantem v sobě obsahovaly protein i po průtoku kolonou, proteinové proužky o mobilitě přibližně 100 kDa s eluovaným proteinem měly naopak nízkou intenzitu. Důvodem je pravděpodobně snížená kapacita nosiče chitin sepharózy, ať již stářím či opakovaným používáním (výrobce uvádí pět regenerací jako maximální počet<sup>29</sup>), nebo vyšší průtoková rychlost při nanášení roztoku/materiálu s dAC. Vlastní chromatografii jsme proto zopakovali s regenerovanou kolonou a sníženou rychlostí průtoku. Tentokrát už došlo k dostatečnému navázání proteinu na kolonu a jeho výskyt v eluovaných frakcích byl vyšší.

### 7.3 Studium protein-proteinové interakce dACL240pM s CaM pomocí kombinace metod PIXL a MS

Protein-proteinovou interakci jsme studovali na námi exprimovaném a izolovaném dACL240pM. Finální preparát jsme podrobili fotolýze a výsledky fotochemického zesílení pozorovali pomocí SDS-PAGE ve 12% polyakrylamidovém gelu.

Zároveň jsme provedli fotolýzu preparátu dACL241pM a následnou SDS-PAGE ve 12% gelu. Fotolýzy jsme provedli za různých podmínek, abychom pro případnou protein-proteinovou interakci vyloučili nespecifity použitím kontrol (absence alespoň jedné ze složek směsi).

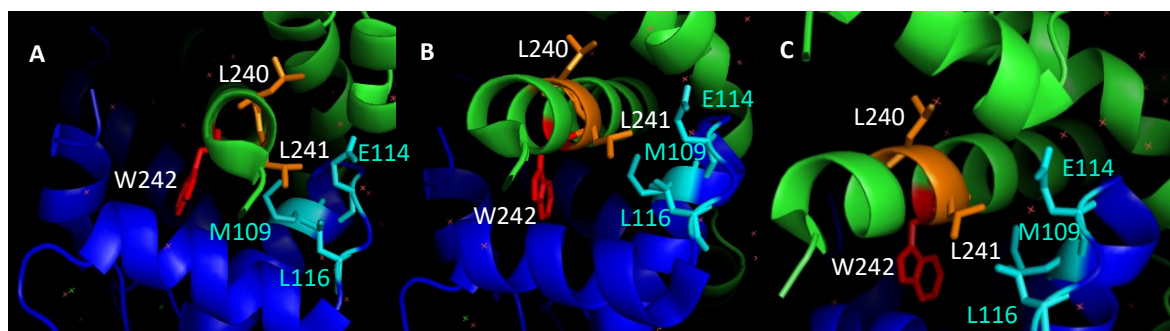
Hlavním a překvapivým zjištěním je, že protein dACL240pM je pravděpodobně schopen v malé míře fotochemického zesílení s CaM. Studované proteiny se spolu, v námi studované oblasti, pojí nekovalentně pomocí hydrofobní interakce, na které participuje Tryptofan 242. Aktivovaný CaM obsahuje v globulární struktuře na C-konci hydrofobní kapsu. Nezbytným aminokyselinovým zbytkem ve struktuře dAC pro hydrofobní interakci v této oblasti je již zmiňovaný Tryptofan 242<sup>27</sup>. Účast na nekovalentní interakci je ale predikována i pro další aminokyseliny, které jsou zobrazeny na Obr.č.22 s příslušnými aminokyselinovými zbytky CaM. Prostorovou orientaci Tryptofanu 242 také ilustruje Obr.č.23 A a B na str. 54.



**Obr.č.22** – Interakce mezi aminokyselinovým řetězcem dAC (váleček označuje  $\alpha$  helix H) v okolí tryptofanu 242 a aminokyselinami hydrofobní kapsy CaM (v černých rámečcích). Interagují spolu postranní řetězce, které se nacházejí do vzdálenosti 4 Å. Převzato z<sup>27</sup>.

Leucin 240 je jednou z mála aminokyselin, která by se v této oblasti do proteinové interakce neměla zapojovat.<sup>27</sup> Právě proto byl zvolen jako případná negativní kontrola pro další vytvořené konstrukty (např. dACL241M). Z toho důvodu jsme předpokládali, že nedojde k fotochemickému zesílení, ani když se na jeho místě vyskytoval pM. Po fotoaktivaci a vzniku karbaniontu byl v malé míře pravděpodobně v blízkosti 5 Å v dosahu interakční

partner na straně CaM a ke vzniku kovalentní vazby překvapivě došlo, jak plyne z našich výsledků specifické tvorby heterodimeru. Velice zajímavým zjištěním tedy je, že v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a CaM, vznikal v drahách SDS-PAGE proužek A (dráha 12-14, Obr.č.18, str. 48) o pohyblivosti odpovídající proteinu o  $M_w$  přibližně 95–100 kDa, což by odpovídalo kovalentnímu dimeru dAC. Toto tvrzení bylo potvrzeno MS analýzou tohoto proteinového proužku, která poskytla signály  $m/z$  odpovídající peptidům dAC. Nicméně intenzita proteinového proužku na SDS – PAGE odpovídá nízké tvorbě kontaktu Leucinu 240 s CaM jak současně plyne i ze sterické orientace tohoto postranního řetězce Leucinu 240. Ta je zobrazena na Obr.č.23 A a C.



**Obr.č.23** – Detail struktury proteinu v okolí tryptofanu 242 (zvýrazněn červeně, W242). Světle zelený je řetězec dAC, tmavě modrý řetězec CaM. Oranžově jsou zobrazeny leuciny 240(L240) a 241(L241). Světle modře jsou zobrazeny postranní řetězce Methioninu 109(M109), Glutamátu 114(E114) a Leucinu 116(L116) na řetězci CaM. Celkem jsou zobrazeny tři snímky A,B,C, zachycující okolí v rozsahu 12 Å od 3 různých aminokyselinových zbytků v různých úhlech: A(12 Å od W242), B(12 Å od L241), C(12 Å od L240) <sup>22</sup>.

Naproti tomu z literatury (<sup>27</sup>) a z Obr.č.23 B a C lze je predikovat možnou interakci Leucinu 241, který směřuje podobnou orientací jako postranní řetězec Tryptofanu 242 do prostoru hydrofobní kapsy interagujícího proteinu CaM, Na Obr.č.23 je zobrazen Methionin 109 a 127, Glutamát 114 a Leucin 116 na řetězci CaM, které jsou také prostorově dobře viditelné v Obr.č.23 A – C. Po vzniku karbaniontu na řetězci dAC se v dostatečné blízkosti vyskytovaly postranní řetězce aminokyselin CaM a mohlo dojít ke vzniku kovalentní vazby. Z obrázku je vidět, že postranní řetězec Leucinu 241 míří částečně směrem jako postranní řetězec tryptofanu 242 do prostoru hydrofobní kapsy interagujícího proteinu.

Dalším faktorem, který jsme při fotolýze mohli zkoumat, byl vliv vápenatých kationtů na interakci dAC s CaM. Podle očekávání došlo k zesílení dAC pouze v reakčních směsích, ve kterých byly vápenaté kationty přítomné spolu s CaM. K zesílení nedošlo, pokud se ve směsi dAC a CaM vyskytovala dostatečná koncentrace EDTA, která volné vápenaté kationty vážala, nebo nebyl přítomen CaM. Tato kontrola ukazuje na specifitu pozorované nekovalentní interakce i pro pM v pozici Leucinu 240.

## 8 Závěr

- Úspěšně se nám podařilo transformovat buňky *E. coli* B834 a v minerálním médiu s pM exprimovat protein dACL240pM s přibližně 50% inkorporací pM. Míru inkorporace jsme určili pomocí hmotnostní spektrometrie.
- Protein jsme izolovali a ve finálním preparátu o objemu 300  $\mu\text{l}$  stanovili koncentraci na  $2,45 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ . To odpovídá výtěžku 1,96 mg proteinu ve finálním preparátu z 1 l použitého média pro expresi.
- Pokusili jsme se o fotochemické zesíťení dACL240pM s CaM. Z výsledného gelu po SDS-PAGE bylo patrné, že k zesíťení mezi proteiny dACL240pM a CaM nedošlo. Naproti tomu byl pozorován vznik homodimeru dAC, ale pouze pokud byl přítomen CaM s  $\text{Ca}^{2+}$ . Důvodem je sterická orientace postranního řetězce pM, který se (stejně jako původní Leucin 240) neúčastní nekovalentní interakce s postranními řetězci aminokyselin v hydrofobní kapse na C-konci CaM.
- K zesíťení proteinů nedošlo, pokud se v reakční směsi nevyskytovaly volné vápenaté kationty. Ty jsou pro interakci těchto proteinů důležitým prvkem, jelikož po navázání mění konformaci CaM na formu schopnou nekovalentní interakce s dalšími proteiny.
- K fotochemickému zesíťení došlo u proteinu dACL241pM. Postranní řetězec pM se nacházel v pozici, kdy mohlo docházet k nekovalentní interakci s postranními řetězci aminokyselin CaM. Ty se nacházely v dostatečné blízkosti (do vzdálenosti 5 Å), což umožnilo vznik kovalentní vazby mezi oběma proteiny.
- Potvrdili jsme předpoklad z predikce (2COL), že dACL240pM není schopný fotochemického zesíťení s CaM.

## 9 Použitá literatura

1. Cherry, J. D. Historical Review Of Pertussis And The Classical Vaccine. *J. Infect. Dis.* **174**, S259–S263 (1996).
2. Fabiánová, K., Zavadilová, J. & Gašpárek, M. Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2018 – epidemiologická situace. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie, SZÚ 2019*, 28(7), Praha
3. Kuchar, E., Karlikowska-Skwarnik, M., Han, S. & Nitsch-Osuch, A. Pertussis: History of the Disease and Current Prevention Failure. *Adv. Exp. Med. Biol.* **934**, 77–82 (2016).
4. WHO | Immunization | Pertussis. *WHO*, dostupné z URL: <http://www.who.int/immunization/diseases/pertussis/en/>. [cit. 28.12.2018]
5. Vaccine Refusals Fueled California's Whooping Cough Epidemic : Shots - Health News : NPR, dostupné z URL: <https://www.npr.org/sections/health-shots/2013/09/25/226147147/vaccine-refusals-fueled-californias-whooping-cough-epidemic>. [cit. 2.1.2019]
6. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies | Clinical Microbiology Reviews, dostupné z URL: <https://cmr.asm.org/content/18/2/326>. [2.1.2019]
7. Pertussis: a concise historical review including diagnosis,...: Reviews in Medical Microbiology, dostupné z URL: [https://journals.lww.com/revmedmicrobiol/Fulltext/2005/08000/Pertussis\\_\\_a\\_concise\\_historical\\_review\\_including.1.aspx](https://journals.lww.com/revmedmicrobiol/Fulltext/2005/08000/Pertussis__a_concise_historical_review_including.1.aspx). [cit. 2.1.2019]
8. Xu, Z. *et al.* Genomic epidemiology of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in China. *Emerg. Microbes Infect.* **8**, 461–470 (2019).
9. Cherry, J. D. How Can We Eradicate Pertussis. in *Hot Topics in Infection and Immunity in Children V* (eds. Finn, A., Curtis, N. & Pollard, A. J.) 41–51 (Springer US, 2009). doi:10.1007/978-0-387-79838-7\_4.
10. Kennedy, D. A. & Read, A. F. Why the evolution of vaccine resistance is less of a concern than the evolution of drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 12878–12886 (2018).
11. Kilgore, P. E., Salim, A. M., Zervos, M. J. & Schmitt, H.-J. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 449–486 (2016).
12. Gregora, Mud. M. Pertuse – stále aktuální hrozba., *Solen medical education*, dostupné z URL: [https://www.pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-201502-0011\\_Pertuse-stale\\_aktualni\\_hrozba.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dpertuse%2Bst%25E1le%26sfrom%3D0%26s%26page%3D30](https://www.pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-201502-0011_Pertuse-stale_aktualni_hrozba.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dpertuse%2Bst%25E1le%26sfrom%3D0%26s%26page%3D30). [cit. 2.1.2019]
13. Nennig, M. E. Prevalence and Incidence of Adult Pertussis in an Urban Population. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **275**, 1672 (1996).
14. Ladant, D. & Ullmann, A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. **7**, 5 (1999).



15. PDB101: Molecule of the Month: Calmodulin. *RCSB: PDB-101*, dostupné z URL: <http://pdb101.rcsb.org/motm/44>. [cit. 14.10.2019]
16. About Glucagon and cAMP | The Biochemistry Questions Site, dostupné z URL: <https://biochemistryquestions.wordpress.com/2008/05/27/about-glucagon-and-camp/>. [cit. 16.12.2019]
17. Hampl, Rndr. R., Studijní skripta k předmětu „Hormony“ pro posluchače Biochemie na PŘF UK v Praze, str.7 (2019)
18. cAMP Pathway, dostupné z URL: <http://www.sivabio.50webs.com/amp.htm>. [cit. 9.10.2019]
19. Linhartová, I. *et al.* RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 1076–1112 (2010).
20. Calmodulin - Proteopedia, life in 3D, dostupné z URL: <http://proteopedia.org/wiki/index.php/Calmodulin>. [cit. 2.1.2019]
21. Linhartova, I., Osicka, R., Bumba, L., Masin, J. & Sebo, P. RTX Toxins: A Review. in *Microbial Toxins* (eds. Gopalakrishnakone, P., Stiles, B., Alape-Girón, A., Dubreuil, J. D. & Mandal, M.) 1–29 (Springer Netherlands, 2015). doi:10.1007/978-94-007-6725-6\_13-1.
22. cya - Bifunctional hemolysin/adenylate cyclase precursor - Bordetella pertussis (strain Toham I / ATCC BAA-589 / NCTC 13251) - cya gene & protein, dostupné z URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P0DKX7>. [cit. 2.1.2019]
23. Bischofberger, M., Iacovache, I. & Gisou van der Goot, F. Pathogenic Pore-Forming Proteins: Function and Host Response. *Cell Host Microbe* **12**, 266–275 (2012).
24. Hoffmann, E. de & Stroobant, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. (J. Wiley, 2007).
25. Preisler, J., Návod k úloze z pokročilých laboratorních cvičení z analytické chemie - MALDI TOF MS, MUNI, Brno, 2019, dostupné z URL: <http://bart.chemi.muni.cz/content/04-teaching/special/Lab%20Cv%20MALDI%202015%20CZ.pdf>, [cit. 9.10.2019]
26. 6.5: Mass Analyzer Time of Flight. *Physics LibreTexts*, dostupné z URL: [https://phys.libretexts.org/Courses/University\\_of\\_California\\_Davis/UCD%3A\\_Biophysics\\_241\\_-\\_Membrane\\_Biology/6%3A\\_Experimental\\_Characterization\\_-\\_Mass\\_Spectrometry\\_and\\_Atomic\\_Force\\_Microscopy/6.5%3A\\_Mass\\_Analyzer\\_Time\\_of\\_Flight](https://phys.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/UCD%3A_Biophysics_241_-_Membrane_Biology/6%3A_Experimental_Characterization_-_Mass_Spectrometry_and_Atomic_Force_Microscopy/6.5%3A_Mass_Analyzer_Time_of_Flight) (2018). [cit. 16.12.2019]
27. Guo, Q. *et al.* Structural basis for the interaction of Bordetella pertussis adenyl cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J.* **24**, 3190–3201 (2005).
28. Šulc, M., Ptáčková R., Biotechnologické aspekty světlem iniciovaného síťování - PIXL (z angl. Photo - Induced Cross - Linking): Nové alternativní techniky pro studium 3D struktury proteinů či vzájemných interakcí. *Biopropect*, 2016, ročník 26, č. 4, str. 79 - 83

29. Datasheet for Chitin Resin (S6651; Lot 0211501), *New England Biolabs*, dostupné z URL:  
<https://international.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/s6651datasheet-lot0211501.pdf?rev=7bd2986d72204f0e9451cdb28cd491f7> [cit. 11.1.2020]

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]